

SÉRIE A, N° 1660

N° D'ORDRE :

2526

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

A. PH. WEBER

Docteur et Ingénieur de l'Université Agronomique de Wageningen (Hollande)

1^{re} THÈSE. — L'INFLUENCE DES HORMONES CRIS-
TALLISÉES SUR LA CROISSANCE
DE CERTAINES ESPÈCES DE LE-
VURES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA
FACULTÉ.

Soutenues le 10 JUN 1936, devant la Commission d'Examen

MM. G. BERTRAND . . . *Président.*

E. DARMOIS . . . }
E. AUBEL . . . } *Examineurs.*

IMPRIMERIE J. DUMOULIN

5, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, 5

PARIS, 1936



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546321_0058

SÉRIE A, N° 1660

N° D'ORDRE :

2526

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

A. PH. WEBER

Docteur et Ingénieur de l'Université Agronomique de Wageningen (Hollande)

1^{re} THÈSE. — L'INFLUENCE DES HORMONES CRISTALLISÉES SUR LA CROISSANCE DE CERTAINES ESPÈCES DE LEVURES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen*

MM. G. BERTRAND . *Président.*

E. DARMOIS . . . }
E. AUBEL . . . } *Examineurs.*

IMPRIMERIE J. DUMOULIN

5, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, 5

PARIS, 1936

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD,
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires :</i>	{	H. E. CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
		A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
		Émile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
				VESSIOT.

PROFESSEURS

G. BERTRAND . . . T Chimie biologique.	L. JOLEAUD . . . Paléontologie.
M. CAULLERY . . . T Zoologie (Évolution des êtres organisés).	ROBERT-LÉVY . . . Zoologie.
G. URBAIN T Chimie générale.	F. PICARD Zoologie (Évolution des êtres organisés).
Émile BOREL . . . T Calcul des probabilités. Phys. mathématique.	Henri VILLAT . . . T Mécanique des fluides et applications.
Jean PERRIN . . . T Chimie physique.	Ch. JACOB T Géologie.
H. ABRAHAM . . . T Physique.	P. PASCAL T Chimie minérale.
E. CARTAN T Géométrie supérieure.	M. FRÉCHET . . . T Calcul différentiel et Calcul intégral.
M. MOLLIARD . . . T Physiologie végétale.	E. ESCLANGON . . T Astronomie.
L. LAPICQUE . . . T Physiologie générale.	M ^{me} RAMART-LUCAS T Chimie organique.
A. COTTON T Recherches physiques.	H. BÉGHIN T Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FOCH Mécanique expérimentale des fluides.
Charles FABRY . . T Enseignem. de Physique	PAUTHENIER . . . Physique (P. C. B.).
Charles PÉREZ . . T Zoologie.	De BROGLIE . . . T Théories physiques.
Léon BERTRAND . T Géologie structurale et géologie appliquée.	CHRÉTIEN Optique appliquée.
P. PORTIER T Physiologie comparée.	P. JOB Chimie générale.
E. RABAUD T Physiologie expérimentale.	LABROUSTE Physique du Globe.
M. GUICHARD . . . Chimie minérale.	PRENANT Zoologie.
Paul MONTEL . . . T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
P. WINTREBERT . T Anatomie et histologie comparées.	BOHN Zoologie (P. C. B.).
L. BLARINGHEM . T Botanique.	COMBES Botanique (P. C. B.).
O. DUBOSCQ . . . T Biologie maritime.	GARNIER T Mathémat. générales.
G. JULIA T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	PÈRÈS Mécanique théorique des fluides.
C. MAUGUIN . . . T Minéralogie.	HACKSPILL Chimie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY . T Pétrographie.	LAUGIER Physiologie générale.
H. BÉNARD T Mécanique expérimentale des fluides.	TOUSSAINT Technique aéronautique
A. DENJOY T Application de l'analyse à la Géométrie.	M. CURIE Physique (P. C. B.).
L. LUTAUD T Géographie physique et géologie dynamique.	G. RIBAUD T Hautes températures.
Eugène BLOCH . . T Physique théorique et physique céleste.	CHAZY T Mécanique rationnelle.
G. BRUHAT Physique.	GAULT Chimie (P. C. B.).
E. DARMOIS . . . Enseign. de Physique.	CROZE Recherches Physiques.
A. DEBIERNE . . . T Physique générale et Radioactivité.	DUPONT T Théories chimiques.
A. DUFOUR T Physique (P. C. B.).	LANQUINE Géologie.
L. DUNOYER . . . Optique appliquée.	VALIRON Mathémat. générales.
A. GUILLIERMOND. T Botanique.	BARRABÉ Géologie structurale et géologie appliquée.
M. JAVILLIER . . . Chimie biologique.	MILLOT Zoologie (P. C. B.).
	F. PERRIN Théories physiques.
	VAVON Chimie organique.
	G. DARMOIS . . . Calcul des probabilités et Physique mathématique.

Secrétaire. A. PACAUD.
Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A MONSIEUR

LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND

Membre de l'Académie des Sciences ;
Membre de l'Académie de Médecine ;
Président de l'Académie d'Agriculture ;
Professeur à la Faculté des Sciences.

Hommages de respectueuse reconnaissance.

A MES PARENTS

INTRODUCTION

Le grand intérêt manifesté ces dernières années à l'égard des hormones qui se sont révélées d'une si grande portée dans le domaine animal et ont trouvé de si nombreuses applications en thérapeutique, ne pouvait manquer d'inciter les chercheurs à étudier aussi leurs actions dans le règne végétal.

Cette recherche était d'autant plus intéressante que certaines substances ressemblant, par leurs propriétés physiologiques, aux hormones sexuelles, ont déjà été décelées dans un grand nombre de plantes.

Le présent travail a été consacré à l'étude de l'influence possible sur la croissance d'organismes unicellulaires appartenant au règne végétal, de certaines hormones connues à l'état chimiquement pur.

En examinant les recherches effectuées jusqu'à présent, il nous a semblé qu'on n'était pas encore arrivé à démontrer avec certitude l'intervention des hormones sur le développement des végétaux. Nous avons pensé que ces résultats douteux étaient dus surtout aux grandes difficultés que présentent les expériences portant sur les plantes d'une organisation supérieure.

Pour nos investigations, nous avons donc fixé en premier lieu notre attention sur le choix d'un organisme végétal, le plus simple possible, afin d'en pouvoir étudier le développement dans des conditions pouvant être déterminées avec le maximum de précision.

A notre avis, la levure convenait le mieux à cette étude. Cet organisme unicellulaire ayant été l'objet de très nombreuses recherches, nous avons donc à notre disposition des connaissances assez complètes sur les conditions dans lesquelles il se développe. Quoiqu'on soit resté assez longtemps dans l'incertitude à ce sujet, on sait à l'heure actuelle que certaines levures sont capables de se développer dans un

milieu purement synthétique. Cette découverte présentait une grande importance pour notre travail.

On sait qu'un certain nombre de levures ne produisent pas la fermentation alcoolique. Afin de pouvoir faire entrer également ces levures dans nos recherches, nous avons décidé de les étudier toutes en aérobiose. En effet, les levures possédant le pouvoir fermentatif sont aussi capables de pousser en présence d'air; la fermentation disparaît alors presque entièrement. Un des principaux avantages de la culture aérobie réside dans le fait qu'elle présente une technique expérimentale relativement simple et que l'on peut obtenir un développement important dans un milieu contenant très peu de sucre.

Nous avons également dirigé notre attention sur la question des conditions de culture telles que la température de croissance et la répartition des cellules dans le milieu nutritif.

Après avoir comparé les différentes méthodes de détermination de la croissance des levures décrites dans la littérature, nous avons fixé notre choix sur la méthode pondérale, qui présente le maximum de précision. Ayant examiné un certain nombre d'espèces de levures, nous nous sommes enfin décidé pour treize d'entre elles, de nature très différentes et répondant bien aux exigences expérimentales.

C'est sur ces levures que nous avons recherché l'influence de huit hormones obtenues à l'état cristallisé.

De ces expériences nous avons tiré la conclusion que les hormones sexuelles femelles aussi bien que mâles peuvent, administrées en quantités minimes, exercer une action favorable sur la croissance de certaines levures.

Quelques autres hormones se sont également montrées actives à l'égard des levures.

En étudiant le problème de la nature de l'action exercée par les hormones, nous nous sommes trouvé en présence de plusieurs possibilités.

Enfin, en continuant les expériences dans lesquelles G. Bertrand démontra la nécessité de la présence de traces de certaines substances minérales dans les processus diastatiques et dans l'activité des vitamines, nous avons cherché à savoir dans quelle mesure ces éléments actifs interviennent dans l'action des hormones sur la levure.

Nous avons réussi à vérifier, ici encore, l'hypothèse de G. Bertrand d'après laquelle l'action des hormones serait également étroitement liée à la présence de certains éléments minéraux.

Nous avons divisé l'exposé de nos recherches en cinq parties :

I. — APERÇU HISTORIQUE.

- a.* Expériences avec la folliculine sur les plantes supérieures;
- b.* Expériences effectuées avec d'autres hormones sur les plantes;
- c.* Expériences avec des hormones sur les organismes unicellulaires.

II. — LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

1. La solution nutritive.
2. La purification des composants de la solution nutritive.
 - a.* La purification de l'eau;
 - b.* La purification des sels;
 - c.* La purification du glucose.
3. La détermination de la croissance.
4. Le thermostat.
5. Les hormones.
6. La préparation des solutions d'hormones.
7. Le choix des levures.
8. La technique expérimentale.
9. L'ensemencement des fioles.
10. La précision de notre méthode.

III. — LES RÉSULTATS DES RECHERCHES SUR L'ACTION DES HORMONES.

1. Expériences avec la folliculine.
2. Expériences avec le benzoate de dihydrofolliculine.
3. Expériences avec la testostérone.
4. Expériences avec l'androstérone.
5. Expériences avec l'insuline.
6. Expériences avec l'adrénaline.

7. Expériences avec la thyroxine.
8. Expériences avec l'hétéro-auxine.
9. Rapports entre la quantité d'hormone ajoutée et son action stimulante.
10. Observations morphologiques.

IV. — L'INFLUENCE DE CERTAINS MÉTAUX ET MÉTALLOÏDES SUR L'ACTION STIMULANTE DE LA FOLLICULINE.

V. — CONCLUSIONS.

Le présent travail, que nous avons l'honneur de présenter à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris comme thèse de doctorat d'État, a été effectué au Laboratoire de Chimie biologique de l'Institut Pasteur, dirigé par M. le professeur Gabriel Bertrand.

C'est une grande joie pour nous de remercier ici cet éminent savant pour les précieux conseils et pour le bienveillant accueil qu'il nous a réservés dans son laboratoire célèbre.

Qu'il nous soit permis d'exprimer ici toute notre gratitude à la Société néerlandaise « Fondation Pasteur », qui nous a donné les moyens de pouvoir, pendant deux ans, effectuer à l'Institut Pasteur les recherches formant le sujet de cette thèse. Nous sommes heureux de pouvoir dire ici encore la profonde reconnaissance que nous portons à M. le professeur S. C. J. Olivier, de l'Université agronomique à Wageningen (Hollande), qui nous a initié à la science chimique, pour l'appui moral et matériel qu'il a bien voulu nous accorder au cours de ce travail.

De même, nous remercions chaleureusement M. le professeur A. J. Kluyver, de l'Université technique de Delft (Hollande), pour les grands services qu'il nous a rendus et le vif intérêt qu'il a bien voulu nous témoigner pendant toutes ces recherches.

Remercions tout spécialement Mlle J. F. Heuvelink, préparateur médico-bactériologique de l'Université d'Utrecht, qui nous a assisté, pendant un an et demi, dans nos recherches qui exigeaient deux manipulateurs, et les camarades de laboratoire qui nous ont si cordialement reçu parmi eux en nous facilitant autant que possible l'exécution de notre travail.

I

APERÇU HISTORIQUE

a. EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE SUR LES PLANTES SUPÉRIEURES

Différentes recherches ont été effectuées, ces dernières années, à propos de l'influence des hormones sur le développement des plantes d'une organisation supérieure. Les premières observations à ce sujet ont été faites en 1931 par Schoeller et Goebel ⁽¹⁾, qui ont constaté une stimulation nette de la floraison chez les jacinthes par action de la folliculine du commerce. En refaisant leurs expériences avec une préparation d'hormone plus pure, ils ont obtenu des résultats analogues, également en opérant sur l'oignon et le blé.

On sait que la folliculine se prépare à partir des urines de femmes enceintes. Or, les investigations de Kögl ⁽²⁾ ont montré que les urines contenaient en général encore une autre hormone. Ce corps, que l'on appelle auxine, possède une influence prononcée sur l'élongation cellulaire chez les végétaux. Il se pourrait donc fort bien que les préparations impures de folliculine contiennent des traces d'auxine qu'il ne faudrait pas négliger. L'action stimulante de telles préparations sur le développement des plantes pourrait être due à l'hormone végétale qui s'y trouve.

Il ressort de la seconde publication sur l'influence de la folliculine sur les plantes ⁽³⁾ que Schoeller et Goebel ont tenu compte de cette possibilité. Ces auteurs ont, en effet, continué leurs expériences en employant une préparation pure, cristallisée, de folliculine, laquelle ne contenait pas d'auxine.

En administrant une fois par semaine trois cents unités internationales de ce produit pur à *Calla aethiopica*, ils ont

obtenu une stimulation appréciable du développement de cette plante.

Encouragés par ces résultats intéressants dans un problème d'une telle portée, Schoeller et Goebel⁽⁴⁾ ont fixé sous forme brevetée leur méthode d'activation de la croissance des plantes.

La signification de leurs recherches s'est trouvée encore élargie du moment où l'on démontra que certaines substances se rapprochant par leur action physiologique des hormones sexuelles étaient non seulement bien plus répandues dans le règne animal qu'on ne l'avait supposé jusque-là, mais que ces mêmes éléments pouvaient également se rencontrer dans le règne végétal.

Ainsi Loewe, Lange et Spohr⁽⁵⁾ ont été les premiers à isoler, en 1927, des substances déclenchant l'oestrus dans différentes plantes telles que les fleurs de *Salix caprea*, d'*Althea rosea*, d'*Impatiens parviflora* et de *Nuphar luteum*. Dohrn, Faure, Poll et Blotevogel⁽⁶⁾ ont retiré des graines, ovaires et autres parties végétales, des extraits possédant une action oestrogène manifeste. Nous ne citerons ici que quelques exemples de cas qui leur ont fourni des résultats positifs : graines de betteraves, des tubercules de pommes de terre, racines de persil, les pulpes de cerises et de prunes, également la levure de bière. Des substances analogues aux hormones sexuelles femelles ont encore été trouvées, d'après les recherches de Fellner⁽⁷⁾, dans la farine et le riz. Walker et Janny⁽⁸⁾ en ont isolé des chatons d'aulne et de l'avoine, Much⁽⁹⁾ les a retirées des fleurs de lilas, de tilleul et d'ortie.

Dans certains cas, on a réussi à démontrer que les substances oestrogènes d'origine végétale étaient non seulement analogues, mais identiques aux hormones sexuelles du règne animal.

Ainsi Butenandt et Jacobi⁽¹⁰⁾ ont isolé des noyaux de palmiers pressés une substance qu'ils ont pu identifier à la folliculine. Les recherches de Skarzynski⁽¹¹⁾ ont montré que l'on pouvait extraire des fleurs femelles de saule un corps identique à la trioxylfolliculine.

Il existe également dans le règne végétal des produits présentant l'action des hormones mâles. Cette découverte est due surtout aux recherches de Loewe et de ses collabora-

teurs ⁽¹²⁾ qui ont montré que de telles substances se rencontrent dans les fleurs mâles de saule et de bouleau et dans la levure de bière.

Pour cet organisme, Glimm et Wadehn ⁽¹³⁾ ont vérifié la découverte de Loewe c. s.

On comprendra donc aisément, vu l'intérêt de ces résultats, que de nombreux chercheurs aient dirigé leur regard vers ce domaine de la science.

Ils ont commencé par refaire les expériences de Schoeller et Goebel et ont obtenu, la plupart du temps, des résultats négatifs. Ainsi, von Euler, Bürstrom et Malmberg ⁽¹⁴⁾ ont trouvé que la croissance de l'orge n'était pas stimulée par la folliculine; Virtanen, von Hausen et Saastamoinen ⁽¹⁵⁾ ne sont pas arrivés à constater d'action en opérant sur la jacinthe et le pois avec des préparations d'hormone pure et impure, provenant de Schoeller. Von Euler et Zondek ⁽¹⁶⁾ n'ont pas réussi non plus à avoir des résultats positifs en faisant agir la folliculine pure sur la jacinthe.

Cependant, Schoeller et Goebel avaient continué leur travail. Le dernier ⁽¹⁷⁾, d'accord avec les résultats de leurs premières expériences, a noté une influence manifeste de la folliculine cristallisée sur la croissance de *Calla aethiopica*, du maïs, du muguet, de l'orchidée, de la tomate et d'autres végétaux.

En 1934, en collaboration avec Schoeller ⁽¹⁸⁾, il découvrit le phénomène curieux de la nécessité de la présence d'une quantité suffisante de lessive de soude pour la formation du sel sodique de la folliculine, si l'on veut obtenir un effet de l'hormone pure sur la croissance des jacinthes « La Grandessa » et « Gertrude ». Enfin, en 1935, ces deux auteurs ⁽¹⁹⁾ relatent les heureux résultats obtenus avec l'hormone pure chez la primevère, l'œillet, le fuchsia et le chrysanthème.

L'influence positive de la folliculine avait été, entre temps, constatée par d'autres chercheurs. Nous ne citerons que les travaux de Janot ⁽²⁰⁾ sur la jacinthe et le muguet, d'Orth ⁽²¹⁾ qui remarqua une stimulation de la croissance de *Cannabis sativa*, *Zea mais*, *Mercurialis annua* et de quelques plantes inférieures, de Scharrer et Schropp ⁽²²⁾ qui ont obtenu une action favorable sur la croissance du froment, du seigle, de

l'orge, de l'avoine et de la betterave sucrière et, en dernier lieu, de Chouard⁽²³⁾ qui nota une stimulation de la floraison des asters.

Évidemment, les critiques ne se sont pas fait attendre. Elles ont surtout été menées par Harder et Störmer⁽²⁴⁾ qui ont répété de la manière la plus précise les expériences de Schoeller et Goebel pour ne jamais obtenir que des résultats négatifs, même en opérant sur les jacinthes que Schoeller et Goebel leur avaient cédées et sur lesquelles ces auteurs avaient enregistré leur premier succès. D'autre part, dernièrement, Marzetti⁽²⁵⁾, Janot⁽²⁶⁾ et Störmer⁽²⁷⁾ ont également obtenu des résultats négatifs. Mentionnons enfin un certain nombre de recherches effectuées avec des préparations impures de folliculine et ayant produit une influence positive. La purification de l'hormone fit, en général, disparaître l'action stimulante. (Voir, entre autres, les travaux de Behrens⁽²⁸⁾, de Gad-Andersen et Jarlov⁽²⁹⁾ et de Scharer et Schropp⁽³⁰⁾).

En résumant les résultats cités au cours de cet aperçu, on se rend compte que, jusqu'à présent, il est impossible d'affirmer avec certitude que les hormones sexuelles femelles interviennent dans le développement des plantes supérieures. Les hormones mâles n'ont pas été étudiées, à notre connaissance, à ce point de vue.

b. EXPÉRIENCES EFFECTUÉES AVEC D'AUTRES HORMONES SUR LES PLANTES

Moins nombreuses que les recherches sur la folliculine sont celles qui ont été consacrées à l'étude de l'action d'autres hormones sur le développement des plantes.

Nous n'en mentionnerons que quelques-unes, pour lesquelles on n'a employé que des hormones à l'état pur. En effet, il est impossible, en opérant avec des extraits d'organe, de savoir si l'action observée doit être attribuée à l'hormone ou bien aux impuretés qui l'accompagnent.

Parmi les hormones qui ont été le plus étudiées à ce point de vue, citons l'adrénaline, la thyroxine et l'insuline.

D'après les expériences de Hykes⁽³¹⁾, la feuillaison des branches de cerisier, de peuplier, de marronnier et de saule,

placées dans un vase contenant de l'eau distillée, était entravée par de minimes quantités d'adrénaline, alors qu'elle se trouvait stimulée par la thyroxine et l'insuline. Krasnoselskaya-Maksimova⁽³²⁾ trouva que l'insuline favorisait la croissance de l'avoine; Yun et Hong⁽³³⁾, en opérant sur les germes de soja, ont noté pour l'insuline une influence stimulante sur la croissance de ces plantes, pour la thyroxine et l'adrénaline, au contraire, une action un peu inhibitrice.

L'action de la thyroxine a été tout particulièrement étudiée par E. E. Davis⁽³⁴⁾ qui nota que le sel sodique de cette hormone stimulait la floraison de l'oignon, alors qu'il possédait une action inhibitrice sur le développement des parties végétatives de cette plante. Florentin et Ehrenfeld⁽³⁵⁾ ont également fait des recherches sur cette hormone; ils ont remarqué qu'une solution contenant 0,001 p. 100 de thyroxine entravait d'abord, mais, au contraire, après quelques jours, accélérât la croissance des racines de l'oignon. Mentionnons enfin que, d'après les expériences de Chouard⁽³⁶⁾, les asters sur lesquels on avait fait agir de la thyroxine montraient un développement inférieur de 25 p. 100 à celui des témoins. Il apparaît donc, d'après ce que nous venons de dire, que dans différents cas on a observé une action des hormones d'origine animale, l'adrénaline, l'insuline et la thyroxine, sur les plantes.

c. EXPÉRIENCES AVEC DES HORMONES SUR LES ORGANISMES UNICELLULAIRES

Il nous faut, à présent, passer en revue les travaux qui ont été effectués au sujet de l'action des hormones sur les êtres unicellulaires.

En mettant de côté les publications dans lesquelles on a utilisé des extraits d'organes, on peut classer les rares recherches qui ont été faites à l'aide d'hormones chimiquement pures, en deux groupes.

Le premier comprend les travaux dans lesquels on a étudié l'action des hormones sur le métabolisme des organismes microscopiques, le second renferme les expériences concernant leurs modifications morphologiques et leur croissance.

Le métabolisme du glucose chez l'animal monocellulaire

Paramaecium semblait être, d'après Burge et Estes⁽³⁷⁾, favorablement influencé par l'insuline; l'adrénaline présentait à de faibles concentrations une action stimulante, à des concentrations plus élevées, au contraire, une action inhibitrice. Torrey, Riddle et Brodie⁽³⁸⁾ ont trouvé que la thyroxine, à des concentrations de 0,0001 p. 100 à 0,01 p. 100, stimulait le métabolisme de cet organisme, mais qu'elle ralentissait la division cellulaire.

Les autres recherches sur ce sujet se rapportent presque toutes à la fermentation alcoolique de la levure de bière.

Citons en premier lieu les travaux de Mossini⁽³⁹⁾ qui, à la suite des recherches concernant l'influence du cholestérol et de l'ergostérol, étudia l'action de la folliculine sur la fermentation alcoolique de la levure de bière. Il arriva ainsi à démontrer que cette hormone augmentait de façon appréciable la formation de l'acide carbonique. Les expériences d'Abderhalden⁽⁴⁰⁾ ont montré que d'autres hormones telles que la thyroxine et l'insuline pouvaient également influencer ce processus. A l'encontre des résultats obtenus par cet auteur, von Euler et Myrbäck⁽⁴¹⁾, de même que Fürth⁽⁴²⁾, ont trouvé que l'insuline n'agissait pas sur la fermentation.

Au cours de leurs recherches sur l'influence de l'adrénaline sur la fermentation alcoolique, Schwartz⁽⁴³⁾ a observé une action fortement stimulante, Popper⁽⁴⁴⁾ n'a noté aucune influence, alors que Pirrone⁽⁴⁵⁾ trouva même un effet inhibiteur.

A part quelques observations de Imsenecky⁽⁴⁶⁾ sur les modifications morphologiques que subissent les cellules de levure sous l'action de l'adrénaline et de l'insuline et de quelques recherches concernant l'influence de la thyroxine sur la division de la paramécie, l'action des hormones sur le développement des organismes unicellulaires n'a pour ainsi dire pas encore été étudiée.

De tout ce qui précède, il apparaît que les hormones ont été, dans certains cas, capables d'influencer le développement des plantes supérieures. Dans le métabolisme des organismes unicellulaires animaux et végétaux, on a également noté parfois une action des hormones. En tenant compte de ce fait et de la présence assez fréquente dans le règne végétal, et même

alors chez les levures, de substances dont l'action physiologique concorde avec celle des hormones sexuelles, il est permis de supposer que certaines hormones peuvent influencer la croissance de ces organismes microscopiques.

Nous nous sommes proposé ici d'étudier de plus près ce problème.

II

LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

I. LA SOLUTION NUTRITIVE

Dans nos expériences, nous avons employé un milieu synthétique pour la culture de la levure. A la suite de l'étude d'un grand nombre de milieux synthétiques décrits dans la littérature, nous avons fixé notre choix sur le milieu de Miss Reader (⁴⁷). Cette solution nutritive, qui contient le glucose en tant que source de carbone et le sulfate d'ammonium en tant que source d'azote, est utilisable d'une façon très générale; en effet, le glucose peut être assimilé par toutes les espèces de levures (⁴⁸), le sulfate d'ammonium par la majorité. En outre, ce milieu contient encore d'autres sels indispensables. La proportion quantitative des éléments constitutifs est la suivante :

	P. 100.
Glucose.	1
SO.	0,3
PO ⁴ H ² K	0,1
PO ⁴ HK ²	0,016
ClNa.	0,050
(NO ³) ² Ca.	0,040
SO ⁴ Mg,7H ² O.	0,070

Comme on le voit, cette solution contient peu de glucose, ce qui permet d'économiser une quantité relativement considérable de ce sucre et, en outre, d'éliminer davantage le risque d'introduction d'impuretés.

Tous les éléments constitutifs, sauf PO⁴HK², peuvent être purifiés d'une manière relativement simple. Nous avons remplacé ce sel par PO⁴HN², lequel est facilement cristallisable

et, pour ne pas changer la composition de la solution nutritive de Reader, nous avons remplacé une certaine quantité de ClNa par une quantité équivalente de ClK .

Selon les observations d'un grand nombre d'auteurs, de petites quantités de certains métaux et métalloïdes sont indispensables à l'accomplissement du processus vital. Généralement, ces catalyseurs minéraux agissent en concentrations infinitésimales. Ce sont surtout les travaux de G. Bertrand⁽⁴⁹⁾ sur l'influence du manganèse dans le développement de l'*Aspergillus niger* qui en ont donné une très belle preuve. Ce savant montra que le manganèse à la dilution extrême de 1 p. 10 000 000 000 exerçait une influence favorisante sur cette mucédinée. Depuis, ces mêmes phénomènes ont été retrouvés pour d'autres organismes. Nous ne citons ici que quelques recherches se rapportant à un certain nombre d'éléments intervenant dans la vie des levures.

Bortels⁽⁵⁰⁾ a trouvé que la croissance, non seulement de l'*Aspergillus niger*, mais encore de la levure, nécessitait la présence de fer et de zinc. Harpuder⁽⁵¹⁾ a démontré que des traces de manganèse stimulent la fermentation de la levure de boulangerie, et Elvehjem⁽⁵²⁾, en ajoutant dans son milieu synthétique un peu de cuivre, a obtenu la croissance optima de la même levure. C'est surtout Graves⁽⁵³⁾ qui a souligné l'importance de la présence dans le milieu nutritif de petites quantités d'iode. Le thallium également semble avoir une influence considérable sur la croissance de la levure. Richards⁽⁵⁴⁾ va même jusqu'à supposer qu'il est possible que le bios de Wildiers n'a été que du thallium.

Les données ci-dessus nous ont amené à ajouter des traces de ces substances actives au milieu de Reader. Ce faisant, nous avons pris en considération le fait que, malgré toutes les précautions, il se peut très bien que les sels nutritifs contiennent encore, même après la purification, des traces des matières mentionnées ci-dessus. En outre, il y a lieu de noter que pendant l'expérience une petite quantité de ces éléments peut, par dissolution partielle de la paroi de verre, s'introduire dans le liquide de culture, et sûrement la quantité de ces matières dissoutes n'est pas toujours la même. Si l'on ajoutait d'avance une certaine quantité de ces éléments actifs,

une petite augmentation de ces éléments par dissolution du verre n'aurait aucune importance.

En tenant compte de ces considérations, nous avons composé notre milieu de façon qu'il contienne par litre :

Glucose	10 gr.
SO ⁴ (NH ⁴) ²	3 gr.
PO ⁴ H ² K.	1 gr.
PO ⁴ HNa ²	0 gr. 1304
ClNa	0 gr. 3926
ClK.	0 gr. 1369
(NO ³) ² Ca	0 gr. 4000
SO ⁴ Mg, 7H ² O	0 gr. 7000
NO ³ Tl	0 gr. 001303
SO ⁴ Mn	0 gr. 002748
SO ⁴ Cu, 5H ² O	0 gr. 000393
SO ⁴ Zn, 7H ² O.	0 gr. 004396
IK	0 gr. 001308
BO ³ H ³	0 gr. 005718

Les quantités ajoutées des éléments actifs correspondent exactement à 1 mgr. de thallium, 1 mgr. de manganèse, 0 mgr. 1 de cuivre, 1 mgr. de zinc, 1 mgr. d'iode et 1 mgr. de bore.

En ajoutant 1 mgr. de fer, sous forme de (SO⁴)³Fe², SO⁴ (NH⁴)², 24H²O et 1 mgr. d'aluminium sous forme de (SO⁴)³Al², SO⁴ (NH⁴)², 24H²O, nous avons toujours obtenu un précipité. C'est pourquoi ces métaux ont été exclus de notre solution nutritive.

Nous avons préparé, dans la règle, 10 litres de solution nutritive à la fois.

Les éléments nutritifs utilisés, sauf le nitrate de calcium, ont été pesés à l'aide de petites cuillers en verre dans des capsules en Pyrex soigneusement nettoyées, sur une balance sensible; ensuite, on les a mis dans une fiole jaugée d'un litre, contenant environ 500 cm³ d'eau pure. Après dissolution des substances, on finit de remplir la fiole à 1 litre.

De nitrate de calcium 4 grammes ont été pesés dans un flacon à tare, bouché à l'émeri, et dissous jusqu'à former un volume de 100 cm³, dans une petite fiole jaugée, bouchée à l'émeri.

Nous avons préparé une solution d'éléments actifs conte-

nant pour 5 cm³ 1 mgr. de thallium, 1 mgr. de manganèse, 0 mgr. 1 de cuivre, 1 mgr. de zinc, 1 mgr. d'iode et 1 mgr. de bore.

La préparation de la solution nutritive a été effectuée de la façon suivante : on a porté dans une fiole jaugée d'un litre, bouchée à l'émeri, successivement environ 500 cm³ d'eau pure, 100 cm³ de la solution d'éléments nutritifs, 10 cm³ de la solution de nitrate de calcium, 5 cm³ de la solution d'éléments actifs, et enfin on a ajouté la quantité d'eau nécessaire pour faire 1 litre.

Nous nous sommes servi dans ces manipulations de pipettes vérifiées. Après avoir bien agité la solution obtenue, nous l'avons versée dans un flacon Pyrex de 2 litres stérilisable à l'autoclave. Entre le bouchon et le goulot du flacon, nous avons mis un petit fil de coton blanc qui avait été au préalable dûment nettoyé en le faisant bouillir successivement dans de l'acide chlorhydrique dilué, dans de la lessive de soude diluée et enfin à plusieurs reprises dans de l'eau pure.

La stérilisation de la solution nutritive a été obtenue par un séjour à l'autoclave à 105° pendant une demi-heure. Dès que l'autoclave s'était refroidi à 100°, nous l'avons ouvert. Les flacons furent immédiatement munis d'un capuchon de cellophane et retirés de l'autoclave pour les laisser refroidir. (Il nous a semblé, en effet, que, après refroidissement dans l'autoclave, la solution prenait une légère coloration jaunâtre.)

Après refroidissement complet, nous avons retiré le petit fil de coton.

La solution nutritive traitée de cette façon est restée absolument limpide et incolore. La concentration en ions H (pH), déterminée d'après la méthode de Michaelis⁽⁵⁵⁾, en était d'environ 6,5.

2. PURIFICATION DES COMPOSANTS DE LA SOLUTION NUTRITIVE

Il est de première importance, au cours des recherches sur les micro-organismes, de bien connaître les conditions dans lesquelles ces expériences sont effectuées. En effet, que de

facteurs de nature inconnue subsistent du fait que l'on a affaire à la matière vivante !

Nous avons donc commencé par soumettre tous les composants du milieu nutritif à une purification poussée. De plus, la quantité de chaque corps, hormis l'eau, soumise à la purification, a été prise suffisante pour nous permettre d'effectuer toute la série des expériences avec une même préparation. La comparaison des résultats en est rendue plus exacte.

a. PURIFICATION DE L'EAU

En tenant compte du fait que notre milieu était constitué par plus de 98 p. 100 d'eau, on comprendra aisément que l'on devait apporter à la purification de ce corps le maximum de soin.

Nous avons purifié l'eau (distillée au préalable suivant les méthodes usuelles dans le laboratoire) en la distillant sous pression réduite, après addition d'une petite quantité d'une solution alcaline de permanganate.

Le distillat ainsi obtenu fut ensuite redistillé, sous pression réduite, dans un appareil spécialement conçu par nous et entièrement construit en verre Pyrex. Nous en donnerons ici une brève description :

L'appareil se compose d'un ballon distillatoire de 5 litres qui se trouve relié par une colonne et un réfrigérant en serpent à un ballon récepteur de 3 litres. La colonne a été construite de façon telle que, en pratique, il soit impossible que des particules liquides soient entraînées par le courant de vapeur. Le dispositif dans la boule inférieure où le courant de vapeur était obligé de changer trois fois de direction, s'est montré, à ce point de vue, particulièrement efficace. La jonction entre la colonne et le ballon distillatoire était réalisée au moyen d'un rodage plat qui tient le vide sans avoir besoin d'être graissé. Il est donc très facile d'ouvrir l'appareil. Les autres points de jonction sont également rodés à sec.

On remplit l'appareil d'eau par l'orifice A en aspirant l'air en C. Le ballon récepteur se vide en remplaçant le bouchon B par un tube à angle droit dont l'extrémité inférieure se trouve au-dessous du niveau du fond du ballon. En soufflant légèrement en A, le ballon se vide par siphonage.

Pendant la marche, l'orifice C se trouve relié par un flacon de sûreté à une trompe. En A l'entrée d'air (filtré à travers un tampon de coton) est réglée de façon telle que le liquide soit soumis à une ébullition tranquille.

En général, la température d'ébullition était de 28° à 30° . A

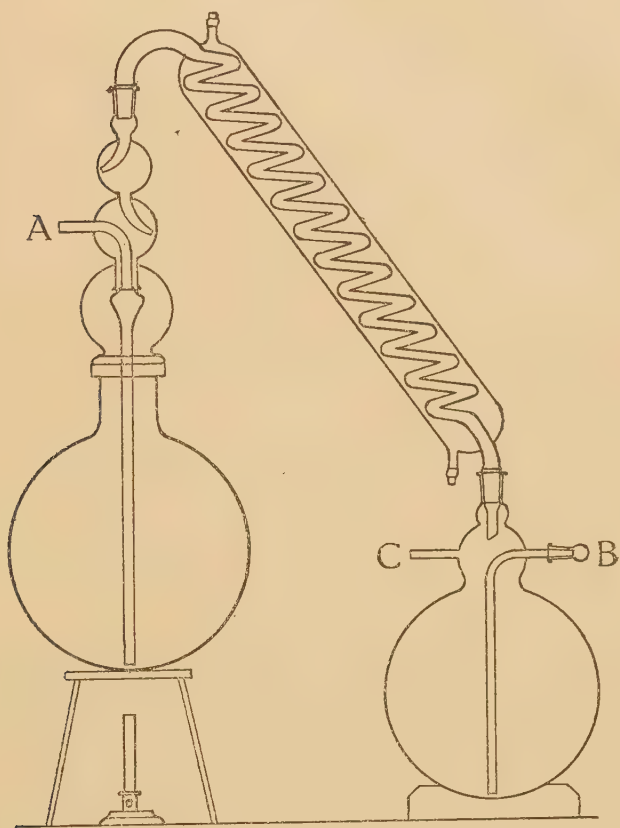


FIG. 1. — Appareil à distillation dans le vide.

cette température, le verre ne se dissout que très faiblement. La vitesse de distillation de l'eau est à peu près trois quarts de litre par heure.

Mentionnons ici quelques avantages de l'appareil :

1° La construction de la colonne et la température basse

sous laquelle a lieu la distillation permettent d'avoir un distillat très pur ;

2° Ce distillat est obtenu et recueilli en évitant tout contact avec des matières autres que le verre ;

3° L'appareil se remplit et se vide facilement (le ballon distillatoire peut être vidé, en aspirant par A, sans qu'il soit nécessaire de démonter l'appareil) ;

4° L'appareil est peu encombrant ;

5° L'appareil se prête parfaitement à la distillation sous pression normale. Dans ce cas, on peut supprimer les morceaux de pierre ponce d'habitude indispensables à une ébullition régulière en faisant passer un faible courant d'air.

b. PURIFICATION DES SELS

Pour les sels faisant partie de notre solution nutritive, nous avons choisi des produits de qualité supérieure, provenant de la maison Rhône-Poulenc.

La propreté parfaite de tout le matériel employé au cours de la purification des sels étant de première importance, nous l'avons nettoyé au moyen d'un chauffage dans un mélange chromique, suivi de rinçages et ébullitions répétés dans de l'eau distillée ; en dernier lieu, nous avons rincé plusieurs fois dans de l'eau bi-, puis tri-distillée.

Pour la cristallisation, on s'est uniquement servi de l'eau la plus pure (distillée trois fois). Dans la purification, nous avons filtré une solution assez concentrée du sel sur un entonnoir filtrant à plaque en verre fritté d'Iéna N° 3G4, de façon telle que la solution n'entrât en contact qu'avec du verre.

Après quoi, on a cristallisé à plusieurs reprises, en évitant tout contact avec le papier, caoutchouc, liège, poussières, etc.

Nous nous sommes efforcé de préparer les sels sous une forme qui leur permette de se conserver sans modifications pendant longtemps. A part les sels à l'état stable dans les conditions normales, tels que SO^4Mg , $7\text{H}^2\text{O}$, SO^4Cu , $5\text{H}^2\text{O}$ et SO^4Zn , $7\text{H}^2\text{O}$, nous avons préparé tous les autres sels à l'état anhydre.

La conservation des sels a eu lieu dans des flacons bouchés à l'émeri placés dans une armoire à dessécher.

c. PURIFICATION DU GLUCOSE

Nous avons également apporté à la purification du glucose le maximum de soin. D'après les nombreuses recherches sur le « bios » (cf. la littérature sur ce sujet, entre autres Tanner⁽⁵⁶⁾ et Lash Miller⁽⁵⁷⁾), il apparaît que certaines impuretés du glucose peuvent sensiblement favoriser la croissance des levures.

Nous avons purifié le glucose (pur anhydre de la maison Kuhlmann) en filtrant une solution chaude dans de l'alcool à 90 p. 100, sur un filtre en verre fritté, par la méthode ci-dessus décrite. Ensuite, nous avons soumis le glucose à deux cristallisations troublées dans l'alcool à 90 p. 100.

Après avoir essoré les cristaux, on les a chaque fois lavés à l'alcool à 90 p. 100. Le produit, très pur, ainsi obtenu, fut desséché dans une capsule en verre pendant trois heures dans l'étuve à 105°. Le point de fusion (vérifié) était de 145°-145°,5.

L'alcool qui a servi à la cristallisation du glucose avait été purifié d'avance d'après la méthode de Plücker⁽⁵⁸⁾ en faisant bouillir dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant 2 litres d'alcool auxquels on ajoute 100 grammes de potasse caustique en pastilles (Rhône-Poulenc) et en distillant ensuite. Cette manipulation a été répétée une fois.

3. LA DÉTERMINATION DE LA CROISSANCE

Le but que nous nous étions assigné était d'étudier l'influence des hormones pures sur le développement des levures.

Il fallait donc, avant tout, connaître une méthode qui nous permît de mesurer avec précision la croissance de cet organisme. La littérature nous en cite plusieurs. Une des plus employées est celle qui utilise comme base de mesure le nombre de cellules présentes dans un certain volume du milieu nutritif. On compte alors les cellules au moyen d'un hémocytomètre de Thoma.

Il nous a paru que cette méthode donne souvent des résultats peu certains. Ceci provient, d'une part, de ce que, dans le cas des levures, les cellules ne se trouvent pas toujours à l'état libre, mais plutôt agglomérées par groupes plus ou moins impor-

tants; d'autre part, de ce que les cellules de certaines levures se fixent avec prédilection sur les parois de verre. Si l'on apporte une goutte de la suspension d'une levure de cette espèce sur l'hémocytomètre, une partie des cellules va toujours se fixer sur la face intérieure de la lamelle couvre-objet. Le nombre de ces cellules peut aller jusqu'à 30 p. 100 du total. Si l'on compte alors le nombre de cellules qui se trouvent sur le quadrillage, on obtiendra un résultat erroné. Quoique nous ayons trouvé une méthode permettant la numération des cellules fixées à la lamelle couvre-objet (au moyen d'un appareil de micro-projection d'après Seibert, dans lequel nous avons placé l'hémocytomètre de Thoma à l'envers), nous avons dû renoncer à cette méthode à la fois longue et fatigante.

Funk et Dubin⁽⁵⁹⁾ ont décrit une méthode permettant de se rendre compte facilement de la croissance des levures. Ces auteurs centrifugent la suspension de levure dans un tube dont la partie inférieure présente un rétrécissement gradué. La hauteur de la colonne de levure permet de déterminer la croissance de celle-ci. On dose donc, par cette méthode, le volume occupé par les cellules. L'inconvénient de la méthode, c'est qu'il faut disposer d'une quantité assez considérable de levure et que les résultats ne sont pas d'une très grande précision.

Ces dernières années, on a souvent déterminé la croissance des levures en mesurant les variations des propriétés optiques de la suspension des cellules au cours de la croissance. On prend en général pour base la quantité de lumière absorbée par la suspension ou bien la quantité de lumière tyndallisée émise par celle-ci. On emploie aussi parfois des associations de ces deux méthodes.

Selon notre avis, il est difficile de savoir quelles conclusions il faut tirer de ces analyses optiques au point de vue de la croissance des levures. En effet, on a constaté que le rapport entre les variations des propriétés optiques et le nombre de cellules d'une suspension n'est pas rigoureusement constant. Il est possible d'obvier quelque peu à cet inconvénient en établissant une courbe d'étalonnage pour chaque espèce de levure. Mais, dès lors, un des principaux avantages de l'analyse optique, à savoir : la grande rapidité avec laquelle on effectue les mesures, n'existe plus.

La méthode présente encore d'autres inconvénients. Ainsi, la plupart des appareils ne donnent que des valeurs relatives; de plus, les résultats ne sont fidèles que lorsqu'il s'agit de suspensions dont l'opacité ne dépasse pas certaines limites. Et même alors la précision n'est pas très grande. La plupart des appareils ne décèlent une variation des propriétés optiques que lorsque le nombre des cellules a varié de 10 p. 100 environ.

Dans nos recherches, il nous est souvent arrivé de ne déceler aucun trouble dans les fioles après l'ensemencement, alors qu'au moment de l'analyse il y avait un trouble très important. Dans de nombreux cas, nous avons eu des multiplications au centuple des cellules de nos levures. De toutes ces constatations on peut donc conclure que la méthode d'optique convenait peu à nos recherches.

Certains auteurs ont déterminé la croissance de la levure en centrifugeant la suspension et en pesant les cellules après lavage et desséchement dans le tube à centrifugation. Cette méthode, à cause des pertes qui se produisent au moment du lavage, nous a semblé également à rejeter.

Notre choix s'est enfin arrêté à la méthode pondérale, préconisée surtout, ces dernières années, par N. Nielsen⁽⁶⁰⁾. Les mesures sont basées ici sur la quantité de matière sèche (ou plutôt de substances non volatilisées après un temps donné à 105°) que l'on obtient après filtration de la suspension de levure, suivi de lavage, desséchement et pesée du résidu.

Après de nombreuses expériences, nous avons trouvé que, en filtrant avec précaution, les creusets filtrants d'Iéna n° IG4 donnaient de bons résultats. Sauf une seule exception (*Rhodotorula glutinis* var. *rubescens*), toutes les levures que nous avons étudiées y étaient quantitativement retenues.

Nous avons ensuite cherché à savoir pendant combien de temps il fallait maintenir le filtre contenant la levure dans l'étuve à 105° pour obtenir un poids constant.

Si l'on filtre une suspension contenant 300 mgr. de levure de boulangerie, le poids du résidu, après un séjour de seize heures à l'étuve à 105°, ne diminue plus. En prolongeant le chauffage, le poids remonte légèrement par suite de l'oxydation qui se produit.

Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que la couche de levure desséchée qui se trouve sur le filtre se déchirait pendant le refroidissement, ce qui entraînait un arrachement de toute la couche superficielle de la plaque filtrante. Remarquons que le filtre en verre n'est pas ou est faiblement attaqué s'il contient moins de 50 mgr. de levure desséchée.

Nous nous étonnons que Nielsen⁽⁶¹⁾, qui a travaillé dans les mêmes conditions, ne mentionne aucune atteinte de ces filtres en verre.

En essayant d'autres méthodes, nous avons séché la levure dans le vide phosphorique et sulfurique à 30° et 40°, mais, dans ces conditions, le poids du résidu continuait encore à baisser au bout de quarante-huit heures. Cette méthode laborieuse et trop longue permettait de garder le filtre intact.

En dernier lieu, nous avons desséché les filtres dans un courant d'air sec et dans un courant d'hydrogène à des températures variant entre 35° et 75°. Dans certaines expériences, on a fait passer le courant gazeux autour des creusets filtrants, dans d'autres il a été aspiré à travers les filtres dans l'un ou dans l'autre sens. Nous avons ainsi obtenu que le verre restât sinon absolument, du moins à peu près intact.

Cette façon d'opérer était compliquée et ne donnait pas encore un résultat entièrement satisfaisant; pour cette raison nous avons enfin déposé sur le fond du creuset une rondelle de papier filtre de première qualité (Berzélius n° 00). Après desséchement à 105° de plus de 100 mgr. de levure, ce papier se déchirait, mais le filtre en verre restait intact.

Au cours des expériences, nous avons déterminé la croissance des levures en retranchant de la quantité de substance sèche formée par la levure après un séjour dans notre milieu nutritif à 30°, la quantité de matière sèche qui, sous forme de levure vivante, nous a servi à ensemercer le milieu.

Pour doser cette dernière quantité, nous avons filtré un volume connu de la suspension destinée à l'ensemencement sur un creuset filtrant en verre d'Iéna n° IG4, pesé au préalable.

En ensemençant toujours les fioles avec 1 cm³ de suspension, il nous était facile de calculer la quantité de matière sèche ayant servi à l'ensemencement.

Les cellules qui étaient restées dans la fiole en étaient retirées à l'aide d'un agitateur dont le bout est revêtu de caoutchouc.

Quand toute la levure se trouvait sur le filtre, nous l'avons lavée plusieurs fois à l'eau distillée et filtrée. Après avoir soigneusement essuyé le creuset, nous l'avons desséché à l'étuve à 105° , pendant seize heures; puis on a pesé le résidu au bout d'un séjour de deux heures dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique.

La pesée a été effectuée avec beaucoup de soin. Le fait que le poids d'un creuset filtrant parfaitement sec augmente de quelques milligrammes dans l'air est bien connu. Nous avons donc porté immédiatement le creuset, retiré du dessiccateur, dans un flacon à tare muni d'un bouchon en verre rodé. Celui-ci se trouvant toujours à côté de la balance est, par conséquent, en équilibre avec l'état atmosphérique de la salle.

Le degré d'humidité de l'air de la salle des balances variant, le poids des flacons à tare se modifie également. Pour connaître le poids absolu du creuset, on aurait dû peser auparavant le flacon à tare. Cependant, cette manipulation, vu le grand nombre de pesées à effectuer, aurait été trop longue et, dans la plupart des cas, inutile. Nous avons donc pesé un flacon à tare pour chaque série de cinq pesées et nous avons corrigé les résultats en conséquence de ces variations qui dépassaient rarement quelques dixièmes de milligramme. D'une façon générale, nos pesées présentaient une précision à 0 mgr. 1 près.

Après usage, nous avons fait bouillir les creusets dans une solution très diluée de NaOH pour les débarrasser de la rondelle de papier filtre; ils furent ensuite plongés dans une solution faiblement alcaline de permanganate de potassium; deux heures après, nous les avons portés dans une solution chaude d'acide chlorhydrique dilué et, après dissolution du MnO^2 , nous les avons longuement lavés à l'eau distillée bouillante. Traités de cette façon, les creusets gardaient toutes leurs propriétés, malgré que ces manipulations fussent fréquemment répétées

4. LE THERMOSTAT

Il était indispensable que les expériences fussent toutes faites dans les mêmes conditions. Si cette constatation n'avait pas été prise en considération, il aurait été impossible de comparer les résultats des expériences faites à des moments différents.

Nous avons donc placé les fioles de culture dans un thermostat, spécialement construit par nous dans ce but, et dont la température était maintenue rigoureusement à 30°,0 C. Ce thermostat se composait d'un réservoir en zinc, rempli d'eau. L'évaporation de l'eau était empêchée par une couche d'huile de vaseline. Le réservoir était placé dans un support en bois et dûment isolé par un carton d'amiante. Le chauffage se faisait au moyen de deux micro-brûleurs auxquels le gaz arrivait après passage à travers un régulateur du type commun, rempli de xylène pur et de mercure distillé. On lisait la température sur un thermomètre sensible qui avait été vérifié par comparaison avec un thermomètre étalon.

Comme on le sait, les cellules d'une suspension de levure se déposent en général assez rapidement au fond. Pour éviter ce fait, nous avons pourvu notre thermostat d'un système destiné à agiter de façon continue une vingtaine de fioles. Le mouvement consistait en cent vingt secousses par minute et était aménagé de façon telle que la suspension contenue dans les fioles n'en éclaboussât pas les parois. Par ce mouvement, nous avons obtenu en même temps une bonne aération régulière.

La couche d'huile a paru empêcher très avantageusement la formation de vagues dans le thermostat.

5. LES HORMONES

Au cours de nos recherches, nous avons étudié l'action des principales hormones obtenues à l'état cristallisé, à savoir : la folliculine (oestron), le benzoate de dihydrofolliculine (oestradiol), l'androstérone, la testostérone, la thyroxine, l'adrénaline, l'insuline et l'hormone végétale l'hétéro-auxine.

A l'exception de l'insuline dont on ne connaît pas encore

la formule, ces hormones étaient chimiquement pures. Ce fait est de première importance dans des recherches telles que les nôtres; s'il n'en était pas ainsi, il serait impossible de dire si l'action observée est due à l'hormone elle-même ou à une impureté qu'elle contiendrait.

La folliculine (oestron) $C^{18}H^{22}O^2$ et le benzoate de dihydro-folliculine $C^{25}H^{29}O^3$ provenaient de la maison « Organon », à Oss (Hollande). Cette société nous indiqua comme point de fusion de la folliculine 258° - 261° , comme pouvoir rotatoire $[\alpha]_D + 164^{\circ}$; 1 gr. de la préparation contient dix millions d'unités internationales.

On sait que l'on trouve la folliculine dans l'urine des mammifères femelles en état de gestation. Dingemanse, Doisy et Butenandt l'en ont retirée à l'état cristallisé. Nous devons aux recherches de ces derniers et de Girard, Marrian, e. a. la découverte de la formule développée de cette hormone.

La folliculine a une influence marquée sur le développement de l'utérus, des glandes mammaires, et sur l'apparition de l'oestrus. Cette propriété de la folliculine sur des rats femelles châtrés sert à doser l'action des préparations. L'unité internationale de folliculine représente 0 mgr. 0001 ou 0,17.

La dihydrofolliculine (oestradiol) se prépare en général par synthèse à partir de la folliculine. D'après les dernières recherches de Doisy et de ses collaborateurs, il est possible de l'isoler de l'extrait d'ovaire.

Dans la thérapeutique, on emploie de préférence la dihydro-folliculine, dont l'action est à peu près semblable à celle de la folliculine, sous forme d'ester benzoïque. En effet, la dihydrofolliculine est plus soluble sous cette forme et produit dans l'organisme une action plus durable. D'après les données de la maison Organon, le point de fusion du produit dont nous nous sommes servi était de 176° - 180° , et l'action sur l'oestrus chez la souris en était deux fois plus énergique que celle de la folliculine.

La testostérone qui nous a servi avait été mise à notre disposition par la maison Roussel; elle avait été obtenue synthétiquement par la méthode de Girard. L'autre hormone mâle, l'androstérone, que nous a remise M. le professeur Gabriel Bertrand, provenait d'un échantillon préparé par

synthèse dans les usines Rhône-Poulenc. La testostérone $C^{19}H^{28}O^2$, hormone découverte par Loewe, Freud et d'autres auteurs dans les extraits de testicule, présente une action très marquée sur les caractères sexuels secondaires des mammifères mâles et sur le développement de la crête chez le chapon. C'est sur cette dernière propriété que l'on s'est basé pour le dosage de cette hormone. En 1935, David, Dingemanse, Freud et Laqueur l'ont, pour la première fois, obtenue sous forme cristallisée. Il est facile, actuellement, grâce aux recherches de Ruzicka et ses collaborateurs, Butenandt et autres, d'en effectuer la préparation au laboratoire.

L'androstérone $C^{19}H^{30}O^2$ peut être retirée des urines de l'homme. L'action physiologique de cette hormone est identique, mais plus faible (surtout pour ce qui concerne les caractères sexuels secondaires chez les mammifères) que celle de la testostérone. La formule développée en a été déterminée par Butenandt et Ruzicka. Ce dernier savant a également réussi à en faire la préparation synthétique.

La thyroxine $C^{15}H^{11}O^4I^4$ provenait de la société Roche. Il nous semble superflu de donner ici les propriétés de cette hormone retirée de la glande thyroïde.

L'adrénaline $C^9H^{13}O^3N$ est, de même que la thyroxine, connue depuis des années.

Nous avons à notre disposition une préparation très pure de ce produit, obtenue, dans le temps, par le professeur G. Bertrand à partir des glandes surrénales de chevaux. La longue conservation de ce produit avait entraîné, par oxydation, une légère coloration brunâtre.

Nous avons d'abord essayé, pour nettoyer cette adrénaline, la méthode décrite autrefois par M. le professeur G. Bertrand⁽⁶²⁾, mais, sur ses conseils, nous sommes arrivé plus facilement au but de la façon suivante. On dissout l'adrénaline dans de l'acide acétique à 10 p. 100 et, après filtration, on ajoute à la solution limpide un peu d'acétate de plomb; ensuite, on envoie dans la solution un courant de H^2S jusqu'à ce que le plomb soit quantitativement précipité. Les produits d'oxydation de l'adrénaline sont entièrement entraînés par les fins flocons du précipité, de sorte qu'après filtration et addition au filtrat de la quantité calculée d'ammoniaque pur à 10 p. 100,

nous avons obtenu des cristaux parfaitement incolores. L'adrénaline est alors séparée par filtration du liquide-mère, et, après lavage soigneux à l'eau filtrée et à l'alcool, on la dessèche dans le vide sulfurique.

Nous avons employé dans nos recherches deux préparations différentes d'insuline. L'une, sous forme cristallisée, provenait de la maison Organon (Hollande), l'autre était un produit amorphe de la maison Roussel. D'après les données, 1 mgr. du premier produit correspondait à 24 unités internationales, 1 mgr. du second contenait 22 unités. Cette hormone, de nature protéidique, retirée du pancréas, se caractérise surtout par son action régulatrice sur le métabolisme des glucides dans l'organisme des mammifères.

La seule hormone végétale que nous avons employée dans nos expériences était l'hétéro-auxine (acide indolyl-3-acétique) $C^{10}H^9O^2N$ découverte par Kögl et Kostermans⁽⁶³⁾ et que l'on retrouve également dans la levure. Nous devons notre préparation à la bienveillance de M. le professeur S. C. J. Olivier, à Wageningen (Hollande), qui a obtenu par synthèse un produit très pur. Le point de fusion en était de 167°,5-168°.

La même préparation a servi à Mlle Gouwentak et Hel-linga⁽⁶⁴⁾ dans une recherche sur la formation des racines. Ces auteurs ont trouvé que de minimes quantités d'hétéro-auxine influencent favorablement la formation de racines sur les boutures provenant d'une plante du genre *Coleus*. Comme l'auxine, l'hétéro-auxine est l'hormone de l'élongation des cellules végétales; dans certains cas, cependant, elle semble favoriser également leur multiplication.

6. LA PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'HORMONES

Toutes les hormones dont nous nous sommes servi dans nos expériences ont été administrées en solution alcoolique, ce qui présente divers avantages.

Premièrement, les hormones sexuelles et l'hétéro-auxine se dissolvent facilement dans ce solvant et ces solutions ont la propriété de pouvoir se conserver pendant un temps assez long sans subir de modification de leur activité. Rowlands et

Callow⁽⁶⁵⁾ ont trouvé, par exemple, qu'une solution alcoolique de folliculine avait conservé, au bout d'un an, son entière activité. Deuxièmement, ces solutions alcooliques sont généralement stériles. En effet, nous n'avons jamais eu d'infection due aux solutions d'hormones.

Au début de nos recherches, le fait d'ajouter une solution alcoolique au milieu de culture nous a semblé présenter un inconvénient. Nous avons alors tenté d'évaporer l'alcool dans la fiole avant d'y introduire le milieu nutritif.

Cette façon d'opérer nous a paru très laborieuse et en même temps elle présentait une difficulté insurmontable: c'est que l'hormone, après évaporation de l'alcool, ne se dissolvait pas dans la solution nutritive.

Nous avons donc abandonné cette méthode et nous avons dorénavant porté dans le milieu de culture l'hormone dissoute dans 0 cm^3 1 d'alcool. La fiole destinée à l'expérience à blanc recevait également 0 cm^3 1 d'alcool.

Il nous a paru que la quantité minime d'alcool qui se trouvait dès lors dans le milieu (à savoir: 0,2 p. 100) ne présentait pas d'influence appréciable sur le développement de la levure.

Nous avons purifié l'alcool éthylique dont nous nous sommes servi dans nos expériences par la méthode décrite à la page 25. Cet alcool était à 98 p. 100.

La pesée des hormones a été effectuée sur une balance sensible. D'une façon générale, nous en avons pesé 25 mgr. 0 dans un petit tube scellé à une extrémité, maintenu sur le plateau de la balance grâce à un support en fil de fer. Ensuite, nous avons porté à l'aide d'une pince le petit tube contenant l'hormone dans un flacon bouché à l'émeri, et nous y avons ajouté 25 cm^3 0 d'alcool pur. La solution contenait alors 100 γ pour 0 cm^3 1.

Dans nos recherches, nous avons toujours étudié l'influence des hormones à des concentrations variables. Ces concentrations étaient de 50 γ , 10 γ , 1 γ et 0,1 γ pour 0 cm^3 1 d'alcool; elles ont été obtenues par addition d'alcool à la solution précédente.

Dans quelques cas, on a également étudié l'action de l'hormone à des concentrations de 100 γ et 0,01 γ pour 0 cm^3 1.

C'est un fait connu que la thyroxine et l'adrénaline sont très peu solubles dans l'alcool.

Pour la thyroxine, nous avons préparé le sel de potassium en ajoutant à la suspension de 25 mgr. 0 d'hormone dans 25 cm³ 0 d'alcool une quantité suffisante (0 cm³ 075) d'une solution alcoolique de KOH pur pour obtenir la dissolution complète.

Nous avons obtenu la solution d'adrénaline par la même méthode en ajoutant la quantité nécessaire (0 cm³ 05) d'acide chlorhydrique concentré et distillé.

Les deux échantillons d'insuline ont été dissous dans de l'alcool à 60 p. 100. La forme cristallisée se dissolvait difficilement.

En étudiant cette hormone, nous avons eu soin d'ajouter à la fiole destinée à l'expérience à blanc 0 cm³ 1 d'alcool à 60 p. 100.

7. LE CHOIX DES LEVURES

Il était important dans les conditions de nos expériences de choisir des levures présentant un développement d'une intensité moyenne.

En effet, il n'est pas probable que le développement d'une levure à croissance rapide soit encore stimulée par la présence d'hormones et, d'autre part, l'étude de levures à croissance lente nous demanderait trop de temps.

De plus, il fallait que les levures choisies donnent une bonne suspension et puissent être filtrées sans perte sur un creuset d'Iéna IG₄.

Nous avons donc commencé par étudier le développement d'un certain nombre de levures dans notre milieu à 30°. Nous nous sommes appuyé dans ce but sur l'expérience de Miss Copping⁽⁶⁶⁾ qui étudia le développement d'une vingtaine de levures dans le milieu de Reader à 28°. Elle trouva que *Hansenula anomala*, *Hansenula saturnus*, *Mycoderma Bordetii*, *Mycoderma cerevisiae* et *Saccharomyces logos* montraient déjà un développement appréciable pendant la première journée.

En étudiant ces espèces de levures, nous nous sommes trouvé d'accord en partie avec Miss Copping. *Mycoderma cerevisiae* et *Saccharomyces logos*, même après un temps plus long, ne montrèrent pas de développement appréciable. En outre,

cette dernière espèce ne pouvait pas être mise en suspension. Les trois autres espèces de levures satisfaisaient à toutes les conditions requises.

En étudiant ensuite la croissance d'autres levures, nous avons trouvé que *Saccharomyces apiculatus* et *Saccharomyces variabilis* (provenant tous deux du laboratoire de microbiologie de l'Université de Wageningen, Hollande) ne se développaient qu'insuffisamment dans notre milieu.

Rhodotorula glutinis var. *rubescens* y poussait trop rapidement et ne semblait pas retenue quantitativement par le filtre IG4. En fin de compte, nous avons réuni treize espèces de levures qui présentaient dans notre milieu de culture une croissance plus ou moins rapide, se laissaient filtrer sans perte et donnaient une bonne suspension.

C'étaient :

Torula monosa Kluyver,
Levure de boulangerie (culture pure),
Hansenula anomala (Hansen) Sydow,
Hansenula saturnus (Klöcker) Sydow,
Mycoderma Bordetii Kufferath,
Torulopsis rotundata Redaelli,
Rhodotorula Suganii Okunuki,
Rhodotorula glutinis var. *Saitoi* (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula rubra var. *longa* Lodder,
Rhodotorula sanniei (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula bronchialis (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula flava (Saito) Lodder,
Rhodotorula longissima Lodder.

Toutes les espèces de levures, étudiées dans les expériences sur les hormones, étaient des cultures pures qui provenaient du « Centraal Bureau voor Schimmelcultures » à Delft (Hollande), grâce à l'obligeance de son directeur M. le professeur A. J. Kluyver. Une seule exception : la culture pure de levure de boulangerie, que nous avons isolée d'un produit du commerce.

Dans notre choix nous avons insisté sur le fait d'avoir, autant que possible, des espèces dissemblables.

Nos levures ont montré de grandes différences au point de

vue non seulement de leurs propriétés physiologiques, mais encore de leur forme et de leur couleur.

Elles étaient également d'origines très diverses. *Rhodotorula bronchialis* a été isolée par Ciferri et Redaelli des crachats d'un malade atteint de broncho-pneumonie ; *Rhodotorula flava* et *Rhodotorula Suganii* ont été trouvées par Okunuki dans l'air de Tokio ; *Rhodotorula sanniei* et *Torulopsis rotundata* ont été isolées par Redaelli dans un cas de tuberculose pulmonaire.

Voici quelques-unes des principales propriétés de nos levures.

En dehors de la levure de boulangerie et des deux espèces *Hansenula*, aucune des levures que nous avons employées ne présente la propriété de former des ascospores.

Seules la levure de boulangerie, *Torula monosa* et les deux *Hansenula* parmi elles produisent la fermentation ; les autres ne peuvent vivre qu'à l'état d'aérobie. Quelques-unes d'entre elles ont tendance à former un voile si l'on ne prend pas la précaution d'agiter le liquide de culture.

Pour caractériser une levure, il faut avant tout savoir si elle peut ou non assimiler du nitrate. A l'exception de la levure de boulangerie, *Torula monosa*, *Rhodotorula rubra* var. *longa*, *Rhodotorula sanniei* et *Rhodotorula flava*, elles en étaient toutes capables.

Comme leur nom l'indique, les levures appartenant au genre *Rhodotorula* sont de coloration rouge. D'après les recherches de Guilliermond, Lederer et d'autres, leurs pigments sont de nature carotinoïde. Nos levures présentaient des colorations différentes : *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula rubra* var. *longa* étaient d'une belle teinte rouge corail ; *Rhodotorula longissima*, *Rhodotorula sanniei* et *Rhodotorula Suganii*, d'un rouge orangé ; *Rhodotorula bronchialis* était d'un orangé éclatant et *Rhodotorula flava* jaune foncé. Les autres levures étaient incolores ou d'un jaune pâle.

Dans leur mode de croissance, les levures présentaient également de grandes différences. A ce point de vue, on pouvait les classer en deux groupes.

Les levures constituant le premier groupe pouvaient, par repiquage, continuer indéfiniment à pousser dans notre milieu

nutritif. C'étaient *Mycoderma Bordetii*, les deux espèces *Hansenula*, *Rhodotorula longissima*, *Rhodotorula bronchialis*, *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Les levures du deuxième groupe ne présentaient dans notre solution une croissance appréciable que pendant la première journée. Si l'on repiquait un peu de la suspension datant de vingt-quatre heures dans une fiole contenant de la solution nutritive fraîche, ces levures ne présentaient plus aucune croissance.

Cette observation permet de conclure que la croissance ne s'arrêtait donc pas à cause d'une carence en éléments nutritifs du milieu, mais qu'elle semblait plutôt dépendre de la présence de certaines substances nécessaires au développement et que l'on apportait dans le milieu de culture en même temps que les cellulesensemencées.

D'accord avec les opinions généralement admises à ce sujet, nous donnerons à ces éléments indispensables à la croissance de certaines levures en milieu synthétique le nom de « bios ».

D'après cette conception, les levures du premier groupe seraient donc capables de produire du bios.

Nos observations à ce sujet concordaient avec celles de Miss Copping⁽⁶⁶⁾.

Cet auteur effectua dix repiquages d'une levure à croissance rapide dans le milieu de Reader. Après avoir laissé pousser le dernier ensemencement pendant quarante-huit heures, elle centrifugea la suspension et stérilisa le liquide obtenu. Un cm³ de ce liquide, ajouté à 25 cm³ de milieu vierge, permit à une levure incapable de pousser sur ce milieu en l'absence de bios, de se développer de façon appréciable. Ainsi, elle a démontré que les deux espèces *Hansenula*, *Mycoderma Bordetii* et quelques autres levures sont capables de produire le bios.

On a dit que les levures qui pouvaient assimiler l'azote sous forme de nitrate étaient capables de produire le bios dans un milieu synthétique, alors que celles qui n'assimilaient pas le nitrate avaient besoin de cette substance. Nos expériences concordent en partie avec cette opinion. Ainsi nous avons trouvé que *Torula monosa*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula sanniei*, *Rhodotorula flava* et la levure de boulangerie ne présentaient qu'une croissance limitée dans notre milieu et néces-

sitaient donc la présence du bios. S'opposant à cette conception, *Torulopsis rotundata*, quoique capable d'assimiler du nitrate, présente également en milieu synthétique un développement restreint.

Remarquons enfin que nous n'avons pas pu confirmer l'opinion de Richards⁽⁶⁷⁾, d'après laquelle le bios de Wildiers pourrait être identifié au thallium; en effet, sur nos treize espèces de levures, six ne pouvaient continuer à pousser en l'absence d'une petite quantité d'extrait de malt, malgré la présence de thallium dans notre milieu de culture.

On trouvera des données plus complètes sur les caractères physiologiques et morphologiques de la plupart des levures que nous avons étudiées dans l'excellente étude de Mlle J. Lodder : *Die anaskosporogenen Hefen*⁽⁶⁸⁾.

Pour la description détaillée des autres, nous renvoyons le lecteur aux ouvrages suivants : *Die sporogenen Hefen*, par N. M. Stelling-Dekker⁽⁶⁹⁾ et *Les Levures*, par A. Guilliermond⁽⁷⁰⁾.

• 8. LA TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La culture des levures a été effectuée dans des fioles coniques en verre Pyrex, de 150 cm³, qui ont été nettoyées par la méthode (décrite page 24) employée pour tout le matériel en verre. Ces fioles étaient bouchées par un tampon de coton assez lâche et stérilisées pendant une demi-heure au four électrique à 170°. On versait le liquide de culture, conservé dans un flacon Pyrex de 2 litres, dans un ballon à goulot court, de 250 cm³ ou 500 cm³, et de là on en portait, au moyen d'une pipette stérile en verre Pyrex, 50 cm³ 0 dans chaque fiole.

Puis, nous y avons ajouté une quantité dosée d'hormone, toujours dissoute dans 0 cm³ 1 d'alcool, à l'aide de pipettes spécialement préparées et vérifiées par nous dans ce but. La fiole destinée à l'expérience à blanc reçut 0 cm³ 1 du même alcool qui avait servi à la préparation de la solution de l'hormone.

Après avoir agité toutes les fioles, nous les avons ensemencées en y portant, au moyen d'une pipette stérile, 1 cm³ 0 de

la suspension de levure. Nous les avons alors immédiatement placées dans le thermostat à secousses mécaniques, réglé à 30°.

Après un développement suffisant de la culture, on a retiré la fiole du thermostat et on l'a laissée refroidir pendant une heure dans la glacière pour arrêter la croissance.

Ensuite, on a filtré la suspension d'après la méthode décrite à la page 29, et on a pesé le résidu sec.

9. L'ENSEMENCEMENT DES FIOLES

Il est difficile d'obtenir un matériel à propriétés constantes pour les expériences effectuées sur les êtres vivants.

Pour les levures, on obtient les meilleurs résultats en partant d'une culture qui a poussé pendant un certain temps dans des conditions données.

Dans la plupart de nos expériences, nous nous sommes servi de cultures qui avaient poussé sur gélose de malt à 30° pendant vingt-quatre heures ; dans quelques cas, nous sommes parti de levures s'étant développées durant vingt-quatre heures à 30° dans notre solution nutritive. Cependant, certaines anomalies qu'on ne peut expliquer se produisent parfois malgré toutes ces précautions.

La suspension destinée à l'ensemencement des fioles était obtenue en portant à l'aide d'un fil de platine une petite quantité de levure du tube contenant le milieu nutritif solide (gélose de malt) dans un tube à essai qui contenait de l'eau stérile, trois fois distillée. Après avoir très bien agité, on aensemencé les fioles à la pipette avec 1 cm³ de la suspension homogène.

Nous avons obtenu un ensemencement d'une grande précision :

- 1° En nous servant de pipettes à pointe bien effilée ;
- 2° En remplissant la pipette de la suspension à ensemen-
cer et en la vidant après quelques secondes, avant de commencer l'ensemencement ;
- 3° En remplissant et vidant lentement la pipette. Cette manipulation demandant un certain temps, les chances d'infection s'en trouvaient augmentées. Heureusement, il a paru

que l'atmosphère du laboratoire de chimie biologique contenait si peu de germes que l'infection ne se produisait qu'exceptionnellement. Ces conditions avantageuses ont bien favorisé la précision de nos recherches.

Il nous a, cependant, été très difficile pour certaines levures d'obtenir un ensemencement précis, celles-ci présentant plus ou moins la propriété de se fixer à la paroi de la pipette.

Nous avons souvent évalué la concentration de la suspension à ensemercer à la vue. Il était cependant nécessaire dans un grand nombre d'expériences de savoir exactement la quantité de levure que l'on ensemait. Dans ce but, nous filtrions une quantité donnée de la suspension à ensemercer sur un creuset filtrant pesé au préalable. Le poids du résidu sec ainsi obtenu permettait de calculer la quantité de matière sèche qui, sous forme de levure vivante, avait servi à l'ensemencement des fioles.

10. LA PRÉCISION DE NOTRE MÉTHODE

Il nous a paru, après de nombreuses expériences, que les récoltes d'une série de fioles de même contenu et ensemencées avec la même quantité d'une certaine levure, en tenant compte de toutes les précautions à prendre, ne différaient généralement les unes des autres que de 5 à 10 p. 100.

En considérant les facteurs intervenant dans ces résultats, à savoir : la quantité de solution nutritive contenue dans la fiole, le nombre de cellules de levure par fiole, la température à laquelle la croissance se fait, l'aération, la filtration, la pesée, il semble bien que les écarts observés doivent provenir de l'ensemencement. Il se peut, en effet, que la suspension dont on est parti, malgré qu'elle ait été bien agitée, ne soit pas entièrement homogène. De plus, les cellules de certaines espèces de levures présentent la propriété de se fixer quelque peu à la paroi de verre de la pipette qui sert à l'ensemencement. C'est, en effet, pour ces espèces (surtout *Rhodotorula Suganii* et, mais de façon moins marquée, les deux espèces *Hansenula*) que nous avons eu les plus grandes variations.

En tenant compte du degré de précision que nous avons obtenu, en moyenne, avec la plupart des espèces de levures,

nous avons pris comme règle générale de ne considérer l'action des hormones comme stimulante que dans les cas où, avec certitude, la différence entre la récolte de l'expérience à blanc et celle d'une fiole contenant de l'hormone était de plus de 10 p. 100.

III

LES RÉSULTATS DES RECHERCHES SUR L'ACTION DES HORMONES

I. EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Nous avons consacré la plus grande partie de nos expériences à l'étude de l'action possible de l'hormone féminine principale, la folliculine, sur la croissance de la levure.

Comme nous l'avons signalé dans la partie historique, on avait déjà observé à plusieurs reprises une intervention marquée dans le développement de certaines plantes supérieures de cette hormone si répandue dans le règne animal et végétal.

Il semblait donc bien possible que la levure, qui contient elle-même des substances se rapprochant de la folliculine, fût influencée par cette hormone.

Nous avons cependant été déçu à ce sujet dans nos premières expériences sur *Torula monosa* et la levure de boulangerie, comme le montrent les chiffres suivants :

TABLEAU I

EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Torula monosa.</i>	Levure de boulangerie.
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	2,0	2,5
Temps de croissance en heures.	24	23
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	12,0	6,1
— avec 0 γ 1 d'hormone . . .	12,7	6,5
— — 1 γ — . . .	13,4	6,4
— — 10 γ — . . .	13,3	6,4
— — 50 γ — . . .	13,0	6,0

Il semble qu'il y ait eu, dans le cas de *Torula monosa*, une légère stimulation, mais il faut tenir compte du fait que l'erreur expérimentale est de 10 p. 100 environ (voir p. 41).

En répétant ces deux expériences maintes fois (et en employant même l'hormone à sa plus forte concentration, c'est-à-dire 100 γ pour 0 cm³ 1), nous n'avons jamais pu constater une action stimulante.

Comme nous l'avons fait remarquer plus haut, ces deux levures appartenaient au groupe qui ne présentait, en l'absence de bios, qu'une croissance limitée dans notre milieu de culture.

Pour que l'on puisse observer une influence de l'hormone, il faut effectuer la détermination avant que la croissance ait atteint son terme.

En général, nous avons satisfait à cette condition et, dans quelques cas, nous l'avons vérifié par l'expérience suivante.

La série se composait alors de deux expériences à blanc et de deux fioles contenant l'hormone. A un moment donné, on a analysé l'un des deux témoins et les deux fioles contenant l'hormone; l'autre témoin continuait à pousser pendant un certain nombre d'heures. Nous avons obtenu, en opérant sur la levure de boulangerie et *Torula monosa*, les résultats suivants :

TABLEAU II
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Temps de croissance en heures.	Récolte en mgr. de matière sèche.
Levure de boulangerie :		
1 ^o Expérience à blanc.	6	1,6
— avec 10 γ d'hormone	6	1,5
— — 50 γ —	6	1,6
2 ^o — à blanc.	30	3,0
<i>Torula monosa</i> :		
1 ^o Expérience à blanc.	10	0,5
— avec 10 γ d'hormone	10	0,5
— — 50 γ —	10	0,6
2 ^o — à blanc.	24	1,1

En répétant ces expériences, nous avons toujours obtenu les mêmes résultats.

La folliculine n'a donc pas d'action sur la croissance de la

levure de boulangerie et de *Torula monosa* dans nos conditions expérimentales.

Ensuite, nous avons étudié trois levures appartenant au groupe de celles pouvant être repiquées indéfiniment sur notre milieu synthétique, *Hansenula anomala*, *Hansenula saturnus* et *Mycoderma Bordetii*.

Dans de nombreuses expériences au cours desquelles nous avons veillé à ce que la mesure de la croissance fût faite avant que les éléments nutritifs du milieu de culture soient épuisés, nous n'avons pu non plus constater une action de la folliculine sur ces espèces de levures. Les chiffres suivants, qui donnent en même temps une idée de la croissance, le démontrent bien. Pour l'ensemencement de ces levures, nous avons employé une suspension dans notre solution nutritive qui y avait poussé durant vingt-quatre heures. En diluant cette suspension, on obtenait la concentration voulue pour l'ensemencement.

TABLEAU III

EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :		
	<i>Hansenula anomala.</i>	<i>Hansenula saturnus.</i>	<i>Mycoderma Bordetii.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	0,1	0,1	0,1
Temps de croissance en heures	41,5	41,5	19,0
Récolte en mgr. de matière sèche dans :			
L'expérience à blanc	68,7	64,2	36,0
— avec 0 γ I d'hormone.	63,6	63,1	39,6
— — 1 γ —	68,6	61,9	37,5
— — 10 γ —	68,9	63,7	36,8
— — 50 γ —	63,3	60,3	35,2

Nous avons remarqué qu'il était difficile d'obtenir avec ces levures à croissance rapide, malgré toutes les précautions, un ensemencement précis. Ainsi, nous avons été obligé de répéter huit fois l'expérience de la folliculine sur *Hansenula anomala* pour obtenir un résultat convenable dans deux cas. Ajoutons qu'à la différence des expériences sur *Torula monosa* et la levure de boulangerie, nous avons pratiqué pour ces levures un ensemencement bien plus clairsemé, à savoir : de 0 mgr. 1 de matière sèche environ.

Avant d'étendre nos expériences à d'autres levures, nous avons cherché à savoir si une variation du pH du milieu entraînait des résultats positifs. En effet, nous avons vu dans notre aperçu historique que Schoeller et Goebel (¹⁸), dans leurs recherches sur l'action de la folliculine pure sur les bulbes de jacinthes (« la Grandessa » et « Gertrude »), n'obtenaient des résultats positifs que lorsqu'ils ajoutaient en même temps que l'hormone une quantité suffisante de NaOH pour en former le sel de sodium.

Nous avons donc cherché à savoir si la folliculine en milieu alcalin avait une action sur nos levures. Il n'était pas facile d'alcaliniser notre milieu par modification de la quantité des sels-tampons. Il se formait, en effet, un précipité; et par chauffage il se dégagait de l'ammoniac. Nous avons alors fait plusieurs expériences dans des milieux alcalins de diverses compositions (à pH initial de 8,0) avec la levure de boulangerie, *Torula monosa* et *Hansenula saturnus*. Il ne nous a, cependant, pas été possible d'obtenir dans ces circonstances une action quelconque de l'hormone en question.

En continuant nos expériences dans notre milieu usuel, nous avons trouvé que la croissance de *Torulopsis rotundata*, levure incapable de produire du bios, n'était pas influencée par la folliculine.

Les résultats ont été totalement différents quand nous nous sommes adressé pour la première fois à *Rhodotorula Suganii*, levure de coloration rouge. Le tableau suivant en fournit une démonstration nette.

TABLEAU IV
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure : <i>Rhodotorula Suganii</i> .
Ensemencement en mgr. de matière sèche	0,1
Temps de croissance en heures	94,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :	
L'expérience à blanc.	3,2
— avec 0 γ 1 d'hormone.	3,1
— — 1 γ —	3,5
— — 10 γ —	17,1
— — 50 γ —	14,3

La petite quantité de 10 γ de folliculine a donc causé ici une stimulation de la croissance de 434 p. 100.

Très étonné par ce résultat, nous avons immédiatement répété l'expérience, en ensemençant cette fois-ci avec une quantité un peu plus importante de levure (correspondant à 0 mgr. 5 de matière sèche) afin de diminuer un peu la durée de l'expérience.

Voici les chiffres :

TABLEAU V
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula Suganii.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . . .		0,5
Temps de croissance en heures.		63,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
1° Expérience à blanc		12,1
2° — — — — —		12,0
— avec 0 γ 1 d'hormone.		12,1
— — 1 γ — — — — —		11,6
— — 10 γ — — — — —		11,3
— — 50 γ — — — — —		10,5
— — 100 γ — — — — —		9,1

On voit que l'hormone n'a nullement exercé une action stimulante, mais, bien au contraire, à de fortes concentrations, elle a entravé la croissance de cette levure.

Avant d'en tirer des conclusions, il nous a semblé indispensable de vérifier ces résultats par plusieurs expériences. Les tableaux suivants prouvent que nous y avons réussi :

TABLEAU VI
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula Suganii.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche.. . . .		0,15
Temps de croissance en heures		88,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc.		4,9
— avec 0 γ 1 d'hormone.		4,6
— — 1 γ — — — — —		9,5
— — 10 γ — — — — —		16,8
— — 50 γ — — — — —		22,7
Stimulation maxima en p. 100.		363

En ensemençant les fioles de l'expérience suivante avec une dilution au 1/5 de la suspension employée ci-dessus, nous avons obtenu une stimulation encore plus prononcée :

TABLEAU VII
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula Suganii</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . . .		0,03
Temps de croissance en heures.		136
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc.		2,7
— avec 0 γ 1 d'hormone.		9,0
— — 1 γ —		12,0
— — 10 γ —		21,4
— — 50 γ —		19,9
Stimulation maxima en p. 100.		69,3

Avec une suspension concentrée, on a trouvé de nouveau que la folliculine n'agissait plus.

TABLEAU VIII
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula Suganii</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . . .		0,44
Temps de croissance en heures.		46
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc.		1,7
— avec 0 γ 1 d'hormone.		1,4
— — 1 γ —		1,4
— — 10 γ —		2,0
— — 50 γ —		1,4

Nous avons vérifié ces faits par différentes autres expériences dont il nous semble superflu de donner ici les résultats numériques.

Remarquons ici qu'on a rencontré de grandes difficultés en manipulant *Rhodotorula Suganii*. Il était, en effet, difficile d'obtenir avec cette levure, de même qu'avec les deux

espèces *Hansenula*, un ensemencement précis à cause de la tendance qu'ont ces cellules à se fixer sur les parois de verre.

Il nous a semblé, à plusieurs reprises, que la fiole qui était ensemencée la première nous fournissait une récolte inférieure à celles des autres fioles d'une même série.

Ayant obtenu ces résultats avec *Rhodotorula Suganii*, il nous a semblé nécessaire d'étudier d'autres levures de coloration rouge. Nous avons commencé ces expériences avec *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* de couleur rouge corail qui, de même que *Rhodotorula Suganii*, présentait dans notre milieu une croissance illimitée.

Comme il apparaît dans les chiffres ci-dessous, nous avons immédiatement obtenu des résultats positifs.

TABLEAU IX

EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure : <i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	0,2
Temps de croissance en heures.	67
Récolte en mgr. de matière sèche dans :	
L'expérience à blanc.	6,7
— avec 0 γ I d'hormone.	6,4
— — 1 γ —	7,0
— — 10 γ —	8,7
— — 50 γ —	11,3
Stimulation maxima en p. 100.	69

Ensuite, nous avons répété l'expérience pour savoir si, comme dans le cas de *Rhodotorula Suganii*, l'action stimulante augmente lorsque la concentration de la suspension servant à l'ensemencement diminue.

Les chiffres suivants prouvent que nous avons pu retrouver pour cette levure ce même phénomène.

TABLEAU X
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .
		—
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	0,45	
Temps de croissance en heures	43	
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc.	8,8	
— avec 0 γ 1 d'hormone.	9,5	
— — 1 γ —	10,0	
— — 10 γ —	10,7	
— — 50 γ —	12,0	
Stimulation maxima en p. 100.	36	

En ensemençant la série suivante avec la même suspension, diluée à trois volumes, nous avons obtenu une augmentation appréciable de l'action stimulante.

TABLEAU XI
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

		Espèce de levure : <i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .
		—
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	0,15	
Temps de croissance en heures.	68,5	
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	4,5	
— avec 0 γ 1 d'hormone.	5,6	
— — 1 γ —	6,9	
— — 10 γ —	7,5	
— — 50 γ —	12,7	
Stimulation maxima en p. 100.	182	

En continuant ces expériences, nous avons obtenu, fût-ce dans d'autres proportions (les propriétés de la levure n'étant jamais entièrement constantes), une vérification complète de ce qui a été observé plus haut.

Dans le tableau suivant, on trouvera résumés les résultats de quelques-unes de ces expériences.

TABLEAU XII
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :			
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .			
Ensemencement en mgr. de mat. sèche.	0,58	0,058	0,33	0,066
Temps de croissance en heures.	43,5	94,5	41,5	66,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :				
L'expérience à blanc.	8,1	5,8	8,8	6,6
— avec 0 γ 1 d'hormone . .	7,9	5,6	8,8	6,9
— — 1 γ — .	8,2	6,5	9,0	7,3
— — 10 γ — .	8,9	9,6	9,2	10,1
— — 50 γ — .	9,3	12,3	9,8	11,9
Stimulation maxima en p. 100.	15	112	11	80

De même que pour *Rhodotorula Suganii*, l'hormone ne présente donc pratiquement plus d'action stimulante quand on ensemence avec une quantité de levure correspondant à 0 mgr. 6 de matière sèche environ.

Nos expériences ont montré que la folliculine n'agit pas sur la croissance des six levures incolores, alors qu'elle présente une influence nette sur les deux levures de coloration rouge. Il semblait donc que la folliculine agit de préférence sur les levures pigmentées.

Afin d'étudier ce point de plus près, nous avons choisi, d'accord avec M. le professeur A. J. Kluyver à Delft (Hollande), les différentes levures pigmentées dont voici la liste :

- Rhodotorula longissima*,
- Rhodotorula bronchialis*,
- Rhodotorula sanniei*,
- Rhodotorula rubra* var. *longa*,
- Rhodotorula flava*.

Comme il a déjà été mentionné plus haut, les deux premières levures pouvaient pousser indéfiniment sur notre milieu, alors que les autres, en l'absence de bios, n'y présentaient qu'une

croissance limitée. Il aurait pu se faire aussi que le pouvoir d'assimiler le nitrate fût en rapport avec l'action de l'hormone.

Or, nous n'avons jamais pu constater, au cours des nombreuses expériences, une action quelconque de la folliculine sur ces levures.

Si l'on recherche les principales différences entre ces levures, d'une part, *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, d'autre part, on remarque surtout une différence dans la vitesse de croissance.

Ce fait ressort nettement des chiffres suivants :

TABLEAU XIII
COMPARAISON DE LA VITESSE DE CROISSANCE
DES LEVURES COLORÉES
DANS LE MILIEU DE READER COMPLÉTÉ
Température : 30°

Espèce de levure :	Ensemencement en mgr. de matière sèche.	Temps de croiss. en heures.	Récolte en mgr. de matière sèche.
<i>Rhodotorula Suganii</i>	0,5	47	3,9
— <i>glutinis</i>	0,5	46,5	7,3
— <i>longissima</i>	0,1	23	13,6
— <i>bronchialis</i>	0,1	23	4,0
— <i>flava</i>	0,5	16	12,1
— <i>sanniei</i>	0,5	16	7,2
— <i>rubra</i>	0,5	21,5	6,0

On voit que *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et surtout *Rhodotorula Suganii* poussent bien plus lentement que les autres.

On pourrait en conclure que l'action de l'hormone ne se fait sentir que pour une vitesse de croissance donnée, assez petite.

Pour vérifier cette considération, nous avons effectué diverses expériences dans lesquelles nous ramenions la vitesse de croissance de *Rhodotorula bronchialis*, par des variations de température, à peu près à celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* à 30°. Il ne nous a cependant pas été possible de constater dans ces circonstances une influence perceptible de la folliculine.

Le ralentissement de la croissance de *Rhodotorula bron-*

chialis ne nous fournissant pas d'argument en faveur de notre hypothèse, nous avons essayé d'y arriver par la méthode opposée, à savoir : en accélérant la croissance de *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Il n'a pas été possible d'obtenir ce résultat par une élévation de la température, mais nous y avons réussi par un autre moyen.

Plusieurs fois déjà, nous nous étions rendu compte qu'après de nombreux repiquages dans notre solution nutritive, ces levures présentaient une croissance de plus en plus rapide. Cette accoutumance au milieu se voit fréquemment chez les micro-organismes.

Nous avons donc effectué vingt repiquages sur milieu de Reader complété ; ainsi nous avons obtenu dans notre milieu une vitesse de croissance bien plus grande, en ensemençant avec ces levures, qu'avec celles toujours cultivées sur gélose de malt. Les chiffres suivants en fournissent une bonne preuve.

TABLEAU XIV

COMPARAISON ENTRE LES VITESSES DE CROISSANCE DE « RHODOTORULA SUGANII » ET « RHODOTORULA GLUTINIS » VAR. « SAITOI » APRÈS 20 REPIQUAGES SUR MILIEU DE READER COMPLÉTÉ ET CELLES APRÈS CULTURE SUR MALT GÉLOSÉ.

Température : 30°

Espèce de levure :	Provenance de la culture :	Ensemencement en mgr. de matière sèche.	Temps de croiss. en heures.	Récolte en mgr de matière sèche.
<i>Rhodotorula Suganii</i>	gélose de malt.	0,54	47	3,9
	milieu Reader C.	0,152	46,5	6,4
<i>Rhodotorula glutinis</i>	gélose de malt.	0,094	70	4,5
	milieu Reader C.	0,091	46,5	11,7

Nous avons recherché l'action de la folliculine sur les deux cultures ainsi modifiées. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XV

EXPÉRIENCES AVEC DES CULTURES DE « RHODOTORULA SUGANII » ET DE « RHODOTORULA GLUTINIS » VAR. « SAITOI », OBTENUES PAR PLUSIEURS REPIQUAGES DANS LE MILIEU DE READER COMPLÉTÉ

Température : 30°

	Espèce de levure :			
	<i>Rhodotorula Suganii.</i> 19° repiquage.	0,038	<i>Rhodotorula glutinis.</i> 20° rep.	26° rep.
Ensemencement en mgr. de mat. sèche.	0,15	0,038	0,091	0,016
Temps de croissance en heures.	46,5	64,5	46,5	48
Récolte en mgr. de mat. sèche dans :				
L'expérience à blanc.	6,8	6,4	11,7	4,9
— avec 0 γ 1 de folliculine.	8,2	6,9	11,5	5,0
— — 1 γ —	6,5	5,2	11,3	5,5
— — 10 γ —	7,1	6,9	12,3	4,6
— — 50 γ —	7,5	7,2	10,6	4,0

Nous voyons que l'hormone ne stimule plus la croissance de ces deux cultures.

Dans quelques cas, nous avons fait des ensemencements exceptionnellement clairsemés (à savoir : ± 0 mgr. 005 de matière sèche), mais, là encore, il ne nous a pas été possible de constater une action de la folliculine.

La folliculine influençait donc fortement la croissance de *Rhodotorula Suganii* et de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* quand on ensemait 50 cm³ de notre milieu avec une suspension diluée de cultures qui avaient poussé toujours sur gélose de malt ; au contraire, il n'était plus question d'action stimulante quand on ensemait avec des suspensions de cultures qui s'étaient accoutumées à notre milieu par des repiquages successifs.

Nous avons cherché alors à savoir (quoique ceci ne présentât pas un intérêt particulier pour nous) si les cultures, modifiées par les repiquages successifs sur milieu de Reader complété, reprenaient leurs anciennes propriétés si on les repiquait quotidiennement pendant quelques semaines sur gélose de malt.

Après avoir subi pendant trois semaines ce traitement, ces cultures présentaient encore dans notre milieu une vitesse de

croissance bien supérieure à celles qui avaient toujours poussé sur gélose de malt. L'hormone n'accélérait pas leur croissance.

Il résulte donc de nos expériences, faites avec la folliculine, que cette hormone favorise fortement la croissance de *Rhodotorula Suganii* et de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, quand on ensemente les fioles avec une suspension diluée contenant environ 0 mgr. 1 de matière sèche. Si, au contraire, on ensemente avec une suspension plus concentrée, l'action stimulante diminue; pratiquement, elle disparaît totalement lorsque l'ensemencement comporte environ 0 mgr. 6 de matière sèche par fiole contenant 50 cm³ de milieu nutritif.

Comment peut-on expliquer ce fait?

Pour cela, il faut tout d'abord bien se rendre compte des phénomènes qui se produisent au cours de la croissance de la levure dans un milieu synthétique.

D'après Slator (⁷¹), la croissance ne débute pas immédiatement après l'ensemencement. Elle serait précédée d'une période d'incubation, généralement de quelques heures (variant avec les espèces de levures et les conditions expérimentales). Après cette période commence un temps d'accroissement logarithmique, suivie d'une phase de croissance ralentie causée soit par l'épuisement du milieu, soit par une accumulation de produits nuisibles provenant du métabolisme, ou bien par une combinaison des deux processus. Enfin, la croissance s'arrête complètement.

Ces dernières années, on a observé pendant la période d'incubation des variations du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Il semble qu'au moment où la croissance débute, ce potentiel a atteint une certaine valeur qui reste constante pendant la période de l'accroissement logarithmique.

Il a paru que, pendant la période d'incubation, les cellules de levures émettent en milieu synthétique certains systèmes d'oxydo-réduction, ce qui entraîne une variation du potentiel du milieu jusqu'à ce que ce dernier ait atteint le niveau nécessaire à la croissance.

Si l'on admet que le milieu doit contenir par unité de volume une quantité donnée de ces systèmes, pour que la croissance d'une certaine levure puisse commencer, il s'en suivra que la période d'incubation diminue proportionnelle

ment à l'augmentation de la quantité de cellules par unité de volume. Ce fait a été vérifié par l'expérience.

Appliquons ces considérations aux phénomènes que nous avons observés; on peut dire alors que la folliculine favorise l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction nécessaire à la croissance dans le cas d'un ensemencement effectué avec une suspension diluée. Si l'ensemencement se fait avec une suspension concentrée, ce potentiel est si rapidement atteint sous l'influence du plus grand nombre de cellules par unité de volume que l'hormone reste sans action.

Dès lors se pose la question de savoir quelle est exactement la nature de l'action de la folliculine.

Plusieurs possibilités se présentent.

En premier lieu, la folliculine pourrait agir en tant que système d'oxydo-réduction. Dans la littérature on ne trouve cependant aucun cas où cette hormone agirait de cette façon. De plus, d'après M. R. Würmser, que nous voulons encore remercier ici de ses bons conseils, il est peu probable que la folliculine intervienne dans nos expériences comme un système d'oxydo-réduction, puisque les concentrations auxquelles elle agissait (nous avons déjà observé une influence nette sur la croissance à 1γ pour 50 cm^3 de liquide nutritif) seraient certainement bien trop faibles.

Il est plus vraisemblable d'admettre que la folliculine agit directement sur les cellules en les stimulant; celles-ci émettent alors dans le milieu de culture une plus grande quantité de systèmes d'oxydo-réduction par unité de temps, ce qui entraîne une diminution du temps d'incubation.

Il va de soi que l'on ne peut avoir aucune certitude sur la façon dont intervient l'hormone, sans faire d'autres recherches approfondies sur la question.

En résumant les résultats obtenus avec la folliculine, nous remarquons que, sur les treize espèces de levures, de nature très différente, étudiées par nous, deux seulement subissaient une action stimulante de la folliculine. Ces deux levures (*Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*) sont de coloration rouge. Cette hormone n'agissait que pour une vitesse de croissance donnée et pour un ensemencement de

moins de 0 mgr. 6 de matière sèche environ pour 50 cm³ de notre milieu. On peut expliquer les phénomènes observés en admettant que l'hormone favorise la formation du potentiel d'oxydo-réduction nécessaire à la croissance.

La folliculine ne semble pas agir en tant que système d'oxydo-réduction; elle interviendrait plutôt en excitant la sécrétion par les cellules de certains systèmes qui, à une concentration donnée, permettent la croissance en milieu synthétique.

Nous verrons dans les chapitres suivants que cette considération peut également s'appliquer à l'action d'autres hormones sur nos levures.

2. EXPÉRIENCES

AVEC LE BENZOATE DE DIHYDROFOLLICULINE

Il semblait raisonnable de s'attendre à des résultats analogues avec le benzoate de dihydrofolliculine, substance qui se rapproche tant de la folliculine aux points de vue chimique et physiologique. Ces deux hormones ne diffèrent que par l'intensité de leur action sur l'organisme humain et animal. Ainsi, le benzoate de dihydrofolliculine est deux fois plus actif que la folliculine dans la formation de l'oestrus chez les souris.

Nous avons étudié son action sur neuf de nos treize espèces de levures, à savoir :

Torula monosa,
Levure de boulangerie (culture pure),
Hansenula saturnus,
Hansenula anomala,
Mycoderma Bordetii,
Torulopsis rotundata,
Rhodotorula Suganii,
Rhodotorula glutinis var. *Saitoi*,
Rhodotorula bronchialis.

De même que pour les expériences avec la folliculine, nous n'avons obtenu, après de nombreux essais, un résultat positif que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var.

Saitoi. Nous n'avons pas trouvé, d'après les résultats de nos expériences, que le benzoate de dihydrofolliculine fût plus actif que la folliculine. Le tableau suivant donne une vue d'ensemble de quelques chiffres obtenus avec ces deux espèces de levures.

TABLEAU XVI

EXPÉRIENCES AVEC LE BENZOATE DE DIHYDROFOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure.			
	<i>Rhodotorula Suganii.</i>		<i>Rhodotorula glutinis.</i>	
Ensemencement en mgr. de matière sèche.	0,62	0,12	0,59	0,10
Temps de croissance en heures	45,5	89,5	41,5	48
Récolte en mgr. de matière sèche dans :				
L'expérience à blanc	3,5	14,8	9,0	5,6
— avec 0 γ d'hormone	3,3	15,8	9,2	5,5
— — 1 γ —	3,3	18,9	9,3	5,5
— — 10 γ —	4,2	20,5	10,0	7,3
— — 50 γ —	»	23,5	»	8,1
— — 100 γ —	5,0	»	8,4	»
Stimulation maxima en p. 100.	40	59	11	45
Stimulation par 10 γ d'hormone	20	39	11	30

On voit que cette hormone prise aux concentrations les plus élevées entrave peu la croissance de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Si l'on examine, en vue d'une comparaison, l'action stimulante de 10 γ de l'hormone, on voit que celle-ci est minime pour un ensemencement concentré, et qu'elle augmente sensiblement quand on enseme avec une suspension diluée. Nous retrouvons donc là le même phénomène, mais moins accentué, que celui observé avec la folliculine.

Nous avons également répété avec cette hormone les expériences dans lesquelles nous ralentissions la croissance de *Rhodotorula bronchialis* au moyen d'un abaissement de la température (voir p. 52). Or, nous n'avons noté aucune action stimulante dans ces conditions.

Le benzoate de dihydrofolliculine favorise donc, de même que la folliculine, la croissance de *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* pour des ensemencements

d'une concentration inférieure à une certaine limite (dans le cas 0 mgr. 7 de matière sèche environ). Elle n'exerce aucune influence sur les autres espèces de levures (6 incolores et une de coloration orangée).

Quoique l'action de cette hormone diffère quelque peu de celle de la folliculine, nous pouvons répéter ici les considérations formulées plus haut à propos de l'action de la folliculine.

3. EXPÉRIENCES AVEC LA TESTOSTÉRONE

L'influence sur la croissance des plantes de l'hormone sexuelle femelle a été maintes fois mentionnée dans la littérature. Des recherches sur l'action de l'hormone sexuelle mâle ne nous sont point connues.

Pour cette raison, il nous a semblé important de faire entrer les hormones mâles dans le domaine de nos investigations, et nous avons commencé par étudier la testostérone que l'on trouve dans le testicule.

On sait que cette hormone présente une action nette sur le développement de la crête du chapon et sur la formation des caractères sexuels secondaires chez les mammifères. Son action sur ces phénomènes est plus énergique que celle de l'androstérone, isolée des urines de l'homme.

En nous appuyant sur nos expériences sur la folliculine et le benzoate de dihydrofolliculine, nous n'avons choisi pour ces recherches que les levures qui nous ont semblé les plus intéressantes à étudier, à savoir : *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, *Rhodotorula bronchialis* et *Hansenula saturnus*.

Ici, de même, nous avons constaté que seule la croissance de *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* subissait une action stimulante. Nous n'avons obtenu aucun résultat positif avec les deux autres levures, quoique nous ayons également étudié *Rhodotorula bronchialis* après diminution de sa vitesse de croissance. Voici les chiffres obtenus dans quelques-unes de nos expériences :

TABLEAU XVII
EXPÉRIENCES AVEC LA TESTOSTÉRONE

Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii.</i>	<i>Rhodotorula glutinis.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . .	0,14	0,1
Temps de croissance en heures	89	65,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	4,6	5,3
— avec 0 γ 1 d'hormone	4,7	5,2
— — 1 γ —	7,7	5,8
— — 10 γ —	10,8	6,3
— — 50 γ —	15,6	8,4
Stimulation maxima en p. 100.	239	58

On remarque, d'après ce tableau, que l'action stimulante se fait surtout sentir chez *Rhodotorula Suganii*.

La testostérone et la folliculine ont donc une action du même ordre de grandeur sur la croissance de nos deux levures.

L'intervention des hormones sexuelles dans le développement de micro-organismes appartenant au règne végétal n'est donc pas particulière aux hormones femelles.

4. EXPÉRIENCES AVEC L'ANDROSTÉRONE

A la suite des expériences sur la testostérone, il nous a semblé intéressant d'étudier également l'action de l'androstérone, l'autre hormone sexuelle mâle, sur la croissance des levures.

Nous avons évidemment choisi pour ces expériences, en plus de *Rhodotorula bronchialis*, les deux levures qui nous ont toujours fourni des résultats si intéressants, à savoir: *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Quoique nous ayons ici encore diminué la vitesse de croissance de *Rhodotorula bronchialis* en abaissant la température, nous n'avons pu obtenir de résultats positifs qu'avec les deux autres levures.

On trouvera dans le tableau suivant quelques-uns des résultats obtenus :

TABLEAU XVIII

EXPÉRIENCES AVEC L'ANDROSTÉRONE

Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii.</i>	<i>Rhodotorula glutinis.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . .	0,12	0,10
Temps de croissance en heures	89	64,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	4,2	8,6
— avec 0 γ 1 d'hormone	4,5	9,0
— — 1 γ —	5,6	10,2
— — 10 γ —	5,7	10,7
— — 50 γ —	6,2	12,2
Stimulation maxima en p. 100.	48	42

On voit que l'action de l'androstérone sur la croissance de *Rhodotorula Suganii* est bien moins importante que celle de la testostérone. Ce fait présente un certain intérêt puisqu'on a observé le même rapport entre les actions de ces deux hormones sur l'animal.

Les hormones sexuelles que nous avons étudiées se caractérisent donc toutes les quatre par une action stimulante sur la croissance de ces deux levures. Il serait d'importance d'étudier également l'action sur la croissance des levures de corps se rapprochant chimiquement des hormones sexuelles, tels que le cholestérol.

On verra, dans les chapitres suivants, que des corps d'une structure très éloignée de celle de nos hormones sexuelles peuvent également favoriser la formation de matière sèche de la levure.

5. EXPÉRIENCES AVEC L'INSULINE

Quoique nous nous fussions proposé de n'étudier que l'action d'hormones chimiquement pures; nous avons fait une exception pour l'insuline dont on ne connaît pas encore la composition exacte. Il nous a semblé intéressant de rechercher l'action sur la croissance des levures de cette hormone qui joue un rôle si important dans le métabolisme des glucides chez les mammifères.

Nous nous sommes servi, dans ces recherches, de deux préparations différentes d'insuline, l'une cristallisée, l'autre amorphe. Nous n'avons pu observer aucune différence d'action entre ces deux produits.

L'action de l'insuline a été étudiée sur sept de nos cultures de levure, à savoir :

Torula monosa,
 Levure de boulangerie,
Torulopsis rotundata,
Rhodotorula Suganii,
Rhodotorula glutinis var. *Saitoi*,
Rhodotorula flava,
Rhodotorula bronchialis.

La concentration la plus forte à laquelle l'insuline a été employée était de 100 γ pour 0 cm³ 1 d'alcool à 60 p. 100.

Ayant effectué un grand nombre d'expériences, nous n'avons observé une influence de cette hormone, et uniquement à de fortes concentrations, que sur *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Voici quelques-uns des résultats obtenus :

TABLEAU XIX
 EXPÉRIENCES AVEC L'INSULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii</i> .	<i>Rhodotorula glutinis</i> .
Ensemencement en mgr. de matière sèche. . .	0,15	0,15
Temps de croissance en heures	91,5	65,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	7,8	8,7
— avec 1 γ d'hormone.	8,2	8,9
— — 10 γ —	8,6	9,6
— — 50 γ —	11,0	9,2
— — 100 γ —	15,1	9,6
Stimulation maxima en p. 100.	94	10

L'insuline active donc très peu la formation de matière sèche de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Nous avons insisté plus haut sur le fait que les résultats des différentes fioles peuvent varier de 10 p. 100 en dehors de toute action hormonale. Mais ayant observé une certaine régularité dans les résultats obtenus avec *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* que nous avons retrouvé dans d'autres essais avec l'insuline, nous nous sommes cru autorisé à parler ici d'une faible stimulation.

6. EXPÉRIENCES AVEC L'ADRÉNALINE

Après nos recherches sur l'insuline, nous avons voulu étudier l'adrénaline qui présente également une action sur le métabolisme des glucides.

Nous avons déjà mentionné que, d'après quelques auteurs, l'adrénaline stimulerait la fermentation alcoolique. Nous avons recherché si la formation de matière sèche de la levure à l'état aérobie serait également favorisée par cette hormone.

Pour ces expériences, nous avons fixé notre choix sur la culture pure de levure de boulangerie, *Hansenula saturnus*, *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*. On y ajoutait l'adrénaline sous forme de chlorhydrate, à des concentrations de 0 γ 1, 1 γ, 10 γ, 50 γ et 100 γ pour 0 cm³ 1 d'alcool à 98 p. 100.

Dans aucun cas nous n'avons pu observer une action stimulante sur la formation de matière sèche par les levures ci-dessus énumérées.

Nous avons remarqué qu'à des concentrations élevées de l'hormone, le contenu des fioles prenait pendant la croissance des levures une légère coloration rosée, par suite de la formation des produits d'oxydation de l'adrénaline.

7. EXPÉRIENCES AVEC LA THYROXINE

Dans la partie historique de notre exposé, nous avons mentionné quelques recherches récentes portant sur l'action de la thyroxine, retirée du corps thyroïde, sur les organismes unicellulaires.

Il a paru, d'après certains auteurs, que cette hormone agissait, dans quelques cas, en inhibant le processus de division

cellulaire ; la thyroxine peut également influencer la fermentation alcoolique.

Dans nos expériences, nous avons étudié l'action du sel potassique de la thyroxine à différentes concentrations sur *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*.

Nous avons diminué la vitesse de croissance de la dernière en abaissant la température.

De même que pour toutes les expériences précédentes, nous n'avons pu constater une action manifeste que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Des chiffres qui vont suivre on peut conclure que la thyroxine ne stimulait que très faiblement cette dernière levure.

TABLEAU XX
EXPÉRIENCES AVEC LA THYROXINE
Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii.</i>	<i>Rhodotorula glutinis.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche. .	0,15	0,1
Temps de croissance en heures	91,5	45
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	7,9	5,8
— avec 0 γ d'hormone	7,6	6,1
— — 1 γ —	7,8	5,7
— — 10 γ —	8,2	6,4
— — 50 γ —	13,6	6,8
Stimulation maxima en p. 100.	72	17

On voit que la thyroxine peut augmenter la formation de matière sèche par la levure. Nous pouvons pour ainsi dire affirmer que l'aspect des cellules ne se trouvant pas modifié sous l'influence de cette hormone, la thyroxine n'entrave pas la multiplication cellulaire (par bourgeonnement) de ces deux levures.

8. EXPÉRIENCES AVEC L'HÉTÉRO-AUXINE

En dernier lieu, nous avons étudié l'hétéro-auxine, hormone végétale (acide indolyl-3-acétique), que l'on obtient facilement par synthèse. Ce corps, très répandu dans le règne végétal,

a été en particulier mis en évidence par Kögl et Koster-mans⁽⁶³⁾ dans la levure de boulangerie.

On a pensé d'abord que cette hormone n'agissait que sur l'élongation des cellules végétales; des recherches très récentes on cependant démontré que l'hétéro-auxine pouvait également exercer une influence sur la division cellulaire.

Gouwentak et Hellinga⁽⁶⁴⁾ ont observé, en effet, qu'elle pouvait provoquer une division des cellules au niveau du tissu méristématique d'arbres en hibernation, alors qu'il ne se produit aucune élongation cellulaire.

Il nous a donc paru d'un certain intérêt d'étudier l'action de cette hormone sur nos levures. Dans ce but, nous avons étudié neuf espèces de levures, à savoir :

Torula monosa,

Levure de boulangerie (culture pure),

Torulopsis rotundata,

Hansenula anomala,

Hansenula saturnus,

Mycoderma Bordetii,

Rhodotorula Suganii,

Rhodotorula glutinis var. *Saitoi*,

Rhodotorula bronchialis.

Les concentrations de l'hétéro-auxine que nous avons employées étaient de 1γ, 10γ, 50γ et 100γ par 0 cm³ d'alcool à 98 p. 100.

De toutes les cultures étudiées, seule celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* a été faiblement influencée. Avec cette levure nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XXI
EXPÉRIENCES AVEC L'HÉTÉRO-AUXINE

Température : 30°		Espèce de levure : <i>Rhodotorula glutinis</i> .
Ensemencement en mgr. de matière sèche.		0,10
Temps de croissance en heures.		48,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc.		6,2
— avec 1 γ d'hormone.		6,5
— — 10 γ —		6,4
— — 50 γ —		6,8
— — 100 γ —		7,4
Stimulation maxima en p. 100.		19

La stimulation observée est trop faible pour pouvoir affirmer que l'hétéro-auxine présente une influence positive sur la reproduction de cette levure.

9. RAPPORTS ENTRE LA QUANTITÉ D'HORMONE AJOUTÉE ET SON ACTION STIMULANTE

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure l'action stimulante des hormones que nous avons étudiées dépendait de la quantité administrée.

En examinant la plupart des résultats obtenus, on voit qu'en général la concentration la plus faible ($0\gamma 1$) n'exerce aucune influence ; l'action observée avec une concentration de 1γ est toujours supérieure à celle obtenue par γ dans le cas des concentrations plus fortes.

Prenons comme exemple la série des résultats fournis par l'action de la folliculine sur *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* (tableau XI, p. 50), nous remarquons qu'à une concentration de 1γ la folliculine produit une stimulation de 53 p. 100. Pour une concentration de 10γ elle donne une augmentation de la récolte de 66 p. 100 par rapport à l'expérience à blanc, pour celle de 50γ une augmentation de 182 p. 100. Pour 1γ , la stimulation était donc, dans ces trois cas, respectivement de 53 p. 100, 6,6 p. 100 et 3,6 p. 100. Nous avons toujours remarqué, au cours de notre travail, cette diminution si rapide.

L'examen de nos résultats nous a permis de constater encore, en comparant la récolte de la fiole contenant 1γ à celles obtenues pour les concentrations de 10γ et de 50γ , que la stimulation variait en général proportionnellement à la quantité d'hormone ajoutée.

Prenons comme exemple la série des résultats obtenus avec *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, à la page 60 (tableau XVII) ; la récolte retirée de la fiole contenant 50γ de testostérone dépasse de 2 mgr. 6 celle obtenue avec 1γ d'hormone. La stimulation est donc de 45 p. 100. En considérant que la différence des teneurs en testostérone des deux fioles est de 49γ , la stimulation pour 1γ est donc de $45 : 49 = 0,92$ p. 100. Pour une différence de 9γ on devra s'attendre, si notre point

de vue est exact, à une stimulation de $9 \times 0,92 = 8,28$ p. 100, Or, nous avons trouvé ici 8,6 p. 100 !

Nous avons pu faire pareille vérification de la proportionnalité entre la stimulation et la quantité d'hormone (à de fortes concentrations) dans plusieurs autres cas.

Il est évident que nous avons souvent constaté des écarts plus ou moins importants à cette règle.

Il nous reste à signaler que la stimulation observée dans la fiole contenant la quantité d'hormone la plus grande (50 γ ou 100 γ) était quelquefois inférieure à celle obtenue dans l'expérience avec 10 γ d'hormone.

Ce phénomène peut s'expliquer en considérant la loi de la concentration optima des principes nutritifs, émise par G. Bertrand (*Z. angew. Chem.*, **44**, 1931, p. 917).

10. OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES

Nous n'avons jamais constaté avec certitude à l'examen microscopique des cellules vivantes des modifications morphologiques appréciables de celles-ci, sous l'influence des hormones que nous avons étudiées.

Remarquons que nos examens revêtent un caractère très provisoire, et que seules des recherches approfondies peuvent fournir une certitude dans cette question.

Au cours des expériences sur les levures colorées, on n'a noté aucune modification des pigments sous l'action des hormones.

IV

L'INFLUENCE DE CERTAINS MÉTALLOÏDES ET MÉTAUX SUR L'ACTION STIMULANTE DE LA FOLLICULINE

Nous avons vu que l'action stimulante de la folliculine (et d'autres hormones) ne se manifestait que chez deux levures pigmentées qui présentaient dans notre milieu, par repiquages successifs, un développement indéfini, et pour une vitesse de croissance bien déterminée de celles-ci.

Nous montrerons par ce qui va suivre que l'action hormonale dépend encore d'autres facteurs.

En exposant la composition de notre solution nutritive, nous avons remarqué que, pour un grand nombre d'auteurs, la présence de quantités minimales de certains éléments était nécessaire au développement des levures.

Dans cet ordre d'idées, nous avons ajouté à notre solution nutritive les principaux de ces éléments actifs, à savoir, par litre : 1 mgr. de thallium, 1 mgr. de manganèse, 0 mgr. 1 de cuivre, 1 mgr. de zinc, 1 mgr. d'iode et 1 mgr. de bore.

En relatant les phénomènes qu'il constata à propos de l'influence de traces de certains métaux sur le processus diastatique et sur l'action des vitamines, G. Bertrand⁽⁷²⁾, dans un mémoire présenté au V^e Congrès de Chimie Biologique, à Bruxelles, en 1935, se résume dans les termes suivants :

« Des expériences d'alimentation, à l'aide de régimes synthétiques, ont apporté la preuve directe de l'ingérence du zinc dans le phénomène global de l'alimentation, et on a tout lieu d'admettre qu'il joue un rôle dans l'envenimation ophidienne, voire dans la fonction de reproduction.

« Un fait d'une grande importance s'est révélé au cours des

expériences se rapportant au rôle physiologique du zinc : c'est la synergie de ce métal avec certaines substances appartenant au groupe des vitamines et à celui des hormones.

« Si l'on se souvient de l'interprétation que j'ai donnée autrefois des processus diastasiques, — à la suite de mes recherches sur la laccase, — on ne pourra s'empêcher de convenir qu'il est logique d'étendre, dès aujourd'hui, aux vitamines et aux hormones la conception que j'ai formulée alors au sujet des diastases, de reconnaître, en conséquence, que les vitamines et les hormones doivent être rangées avec les diastases parmi les catalyseurs.

« Comme dans le cas de la laccase et des autres systèmes diastasiques, les vitamines et les hormones n'agiraient pas seules, mais en connexion avec d'autres substances, parmi lesquelles peuvent se trouver certains métalloïdes et métaux, ou, du moins, des combinaisons relativement simples de ces métalloïdes et de ces métaux.

« Pas plus, cela va de soi, que dans ma conception primitive, n'est exclue ici l'intervention de substances complexes de fonctions chimiques déterminées, se comportant dans les catalyses en vertu même de ces fonctions. »

En collaboration avec M. G. Bertrand ⁽⁷³⁾, nous nous sommes donc posé la question du rôle que jouaient les éléments actifs de notre milieu dans l'action stimulante que nous avons observée avec la folliculine.

Dans ces expériences nous avons étudié la croissance de la levure qui s'y prêtait le mieux, à savoir : *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, dans quatre milieux différents :

- I. Le milieu de Reader seul.
- II. Le milieu de Reader + 1 mgr. de zinc par litre.
- III. Le milieu de Reader + 1 mgr. de thallium + 1 mgr. de manganèse + 0 mgr. 1 de cuivre + 1 mgr. d'iode + 1 mgr. de bore par litre.
- IV. Le milieu III + 1 mgr. de zinc par litre.

Dans chacun de ces milieux nous avons effectué deux séries d'expériences : l'une à blanc, l'autre avec 50γ de folliculine.

Comme toujours, chaque fiole contenait 50 cm³ de liquide nutritif, et elle étaitensemencée avec 1 cm³ d'une suspension

de culture de vingt-quatre heures sur malt gélosé, qui renfermait 0 mgr. 1 de matière sèche. Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XXII

EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .	
Ensemencement en mgr. de mat. sèche.	0,1	
Temps de croissance en heures.	51,5	
Récolte en mgr. de mat. sèche dans :	le milieu I	le milieu II
L'expérience à blanc.	3,0	3,1
L'expérience avec 50 γ d'hormone. . .	3,1	6,4
Stimulation en p. 100	—	106

On voit qu'en l'absence de zinc aucune stimulation ne s'est produite.

D'après les chiffres obtenus dans les deux expériences à blanc, il apparaît que la croissance de la levure est normale en l'absence de zinc et que la présence de ce corps ne la stimule nullement.

Le zinc étant considéré par différents auteurs comme indispensable au développement de la levure, il faudra conclure des chiffres obtenus que le milieu de Reader, malgré la purification de ses constituants, contient encore une quantité suffisante de zinc pour permettre la croissance de cet organisme.

Nous avons ensuite cherché à savoir si, en dehors du zinc, l'action stimulante de la folliculine dépendait d'autres éléments actifs.

On trouvera dans le tableau suivant les résultats de ces expériences.

TABLEAU XXIII

EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE

Température : 30°

	Espèce de levure :		
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .		
Ensemencement en mgr. de mat. sèche.	0,1		
Temps de croissance en heures	53		
Récolte en mgr. de mat. sèche dans :	milieu I	milieu III	milieu IV
L'expérience à blanc	3,8	4,0	4,8
— avec 50 γ d'hormone . .	4,4	5,0	8,6
Stimulation en p. 100	16	25	79

En l'absence des éléments actifs, la stimulation produite par la folliculine est minime; celle-ci augmente quand on ajoute du thallium, du manganèse, du cuivre, de l'iode et du bore; mais elle n'est vraiment très prononcée qu'en présence du zinc.

En examinant les récoltes obtenues dans les expériences à blanc, on note que le zinc semble avoir manifesté, là aussi, une action, quoique moins importante. Nous avons enfin contrôlé et étendu les résultats ci-dessus par l'expérience suivante :

TABLEAU XXIV
EXPÉRIENCES AVEC LA FOLLICULINE
Température : 30°

	Espèce de levure :			
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .			
Ensemencement en mgr.	—	—	—	—
de matière sèche . . .	0,1			
Temps de croissance en heures	67			
Récolte en mgr. de mat. sèche dans :	milieu I	milieu II	milieu III	milieu IV
L'expérience à blanc.	3,3	3,6	3,4	4,0
— avec 50 γ				
d'hormone	3,7	9,0	9,8	14,4
Stimulation en p. 100. .	12	150	178	260

On constate ici, quoique dans une autre mesure, les mêmes phénomènes remarqués plus haut. Nos résultats prouvent donc que l'action de la folliculine sur *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* ne se fait nettement sentir que si le milieu de culture contient certains métalloïdes et métaux en petites quantités. Parmi ces éléments, c'est le zinc qui est le plus important.

Nous avons ainsi vérifié l'hypothèse de G. Bertrand, d'après laquelle l'action des hormones ne peut se manifester qu'en présence de certains catalyseurs minéraux.

V

CONCLUSIONS

En étudiant le problème de l'action possible des hormones (à l'état pur) sur la croissance de la levure dans un milieu nutritif purement synthétique, nous avons constaté les points suivants :

I° La détermination quantitative de la croissance de la levure (formation de matière sèche), telle que nous l'avons effectuée, a fourni, contrairement aux autres méthodes préconisées, des résultats suffisamment précis.

II° Les récoltes obtenues dans des fioles contenant le même milieu, etensemencées avec la même quantité d'une suspension de levure donnée, présentent, si l'on prend toutes les précautions nécessaires, des différences de 5 à 10 p. 100 entre elles.

III° L'opinion de Richards, d'après laquelle le bios de Wildiers ne serait que du thallium, ne saurait être justifiée, puisque six espèces de levures n'ont manifesté dans notre solution nutritive, qui contenait du thallium, qu'une croissance limitée si l'on ne prenait soin d'y ajouter une petite quantité de moût de bière.

IV° Sur les treize espèces de levure étudiées par nous, nous n'avons noté une stimulation de la formation de matière sèche par l'action des hormones que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Ces deux espèces présentent une pigmentation rouge; elles peuvent, par repiquages successifs, pousser indéfiniment sur notre milieu de culture synthétique.

V° Nous avons étudié les hormones suivantes : la folliculine, le benzoate de dihydrofolliculine, la testostérone, l'androstérone, l'insuline, l'adrénaline, la thyroxine et l'hormone végétale l'hétéro-auxine.

VI° La folliculine, le benzoate de dihydrofolliculine et la testostérone à des concentrations de 0,0001 p. 100 agissaient en stimulant fortement la formation de matière sèche des deux espèces de levures nommées plus haut ; l'androstérone s'est montrée moins active. L'insuline et la thyroxine à la même concentration stimulaient de façon appréciable la croissance de *Rhodotorula Suganii*, faiblement celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. L'adrénaline n'a pas présenté d'action manifeste et l'hétéro-auxine stimulait dans une faible mesure le développement de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* seulement.

VII° L'action stimulante disparaît quand onensemence les fioles avec une quantité de levure correspondant à 0 mgr. 6 de matière sèche environ. L'addition d'une plus grande quantité d'hormone reste sans effet. L'influence de l'hormone se manifeste au-dessous de cette limite et la stimulation augmente quand la quantité de cellules à ensemenecer diminue.

VIII° De même, l'action stimulante de l'hormone disparaît quand on accélère, par des repiquages successifs dans notre milieu, la croissance de *Rhodotorula Suganii* et de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Cette action dépend donc de la vitesse de croissance.

IX° En tenant compte du rapport existant entre la concentration des cellules après l'ensemencement et la mesure dans laquelle l'hormone stimule, on peut admettre que cette substance favorise l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction, nécessaire à la croissance. La folliculine n'agit vraisemblablement pas en tant que système d'oxydo-réduction, mais plutôt par une stimulation directe de la cellule.

X° En étudiant la signification de la présence de certains éléments minéraux dans notre milieu de culture dans le cas de la folliculine agissant sur *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, nous avons remarqué que la stimulation n'a pas lieu ou se manifeste très faiblement quand on opère dans le milieu de Reader. Dès que l'on ajoutait du zinc à ce milieu, l'hormone possédait une influence appréciable, qui se trouvait encore augmentée par addition des autres éléments contenus dans notre milieu habituel (à savoir : thallium, manganèse, cuivre, iode et bore).

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. SCHOELLER (W.) et GOEBEL (H.). — *Biochem. Z.*, **240**, 1931, p. 1.
2. KOEGL (F.). — *Ber.*, **68**, 1935, p. 16; *Naturwissenschaften*, **23**, 1935, p. 839.
3. SCHOELLER (W.) et GOEBEL (H.). — *Biochem. Z.*, **251**, 1932, p. 223.
4. SCHOELLER (W.) et GOEBEL (H.). — *Brevets U. S.* 1 929 079, 3 octobre 1933, et *U. S.* 1 968 176, 31 juillet 1934.
5. LOEWE (S.), LANGE (F.) et SPOHR (E.). — *Biochem. Z.*, **180**, 1927, p. 1.
6. DOHRN (M.), FAURE, POLL et BLOTEVOGEL. — *Med. Klinik*, **1926**, p. 1437.
7. FELLNER (O. O.). — *Med. Klinik*, **1926**, p. 1886.
8. WALKER (B. S.) et JANNY (J. C.). — *Endocrinology*, **14**, 1930, p. 389.
9. MUCH (H.). — *Muench. Med. Wochenschr.*, **1931**, p. 1992.
10. BUTENANDT (A.) et JACOBI (H.). — *Z. physiol. Chem.*, **218**, 1933, p. 104.
11. SKARZYNSKI (A.). — *Nature*, **131**, 1933, p. 766.
12. LOEWE (S.), VOSS (H. E.), LANGE (F.) et SPOHR (E.). — *Endokrinologie*, **1**, 1928, p. 39. — LOEWE (S.), VOSS (H. E.) et ROTHSCCHILD (E.). — *Biochem. Z.*, **237**, 1931, p. 214; **244**, 1932, p. 355.
13. GLIMM (E.) et WADEHN (F.). — *Biochem. Z.*, **197**, 1928, p. 197.
14. EULER (H. von), BUERSTROM (D.) et MALMBERG (M.). — *Archiv. Kemi Mineral. Geol.*, **11 B**, 1934, n° 38.
15. VIRTANEN (A. I.), HAUSEN (S. von) et SAASTAMOINEN (S.). — *Bioch. Z.*, **272**, 1934, p. 32.
16. EULER (H. von) et ZONDEK (B.). — *Biochem. Z.*, **271**, 1934, p. 64.
17. GOEBEL (H.). — *Arch. Pharm.*, **271**, 1933, p. 552.
18. SCHOELLER (W.) et GOEBEL (H.). — *Biochem. Z.*, **272**, 1934, p. 215.
19. SCHOELLER (W.) et GOEBEL (H.). — *Biochem. Z.*, **278**, 1935, p. 298.
20. JANOT (M. M.). — *Compt. rend.*, **198**, 1934, p. 1175.
21. ORTH (H.). — *Z. Botan.*, **27**, 1934, p. 565.
22. SCHARRER (K.) et SCHROPP (W.). — *Biochem. Z.*, **281**, 1935, p. 314.
23. CHOUARD (P.). — *Compt. rend. Soc. biol.*, **117**, 1934, p. 1180.
24. HARDER (R.) et STOERMER (I.). — *Jahrbuch f. wiss. Botan.*, **80**, 1934, p. 1; **81**, 1935, p. 383. *Biochem. Z.*, **280**, 1935, p. 126.
25. MARZETTI (F.). — *Chim. ind. agr. biol.*, **11**, 1935, p. 277.
26. JANOT (M. M.). — *Compt. rend.*, **200**, 1935, p. 1238.
27. STOERMER (I.). — *Biochem. Z.*, **285**, 1936, p. 29.
28. BEHRENS (W. U.). — *Z. Pflanzenern. Duengung u. Bodenk.*, **39**, 1935, p. 140.

29. GAD-ANDERSEN (K.) et JARLOV (E.). — Acta Med. Scand., **84**, 1934, p. 241.
30. SCHARRER (K.) et SCHROPP (W.). — Z. Pflanzenern. Duengung u. Bodenk., **13 B**, 1934, p. 1.
31. HYKES (O. V.). — Compt. rend. Soc. biol., **113** (n° 2), 1933, p. 629.
32. KRASSNOSSELSKY-MAXIMOW (T. A.). — Bull. appl. bot. USSR Série **3**, 1933, p. 164.
33. YUN (I. S.) et HONG (W. L.). — J. Chosen Med. Assoc., **24**, 1934, p. 568.
34. DAVIS (E. E.). — Plant Physiol., **9**, 1934, p. 377.
35. FLORENTIN (P.) et EHRENFELD (M.). — Compt. rend. Soc. biol., **118**, 1935, p. 1003.
36. CHOUARD (P.). — Compt. rend. Soc. biol., **117**, 1934, p. 1180.
37. BURGE (W. E.) et ESTES (A. M.). — Endocrinology, **12**, 1928, p. 157.
38. TORREY (H. B.), RIDDLE (M. C.) et BRODIE (J. L.). — J. Gen. Physiol., **7**, 1925, p. 449.
39. MOSSINI (A.). — Chimica e Industria, **17**, 1935, p. 524.
40. ABDERHALDEN (E.). — Fermentforschung, **8**, 1925, p. 227; **9**, 1927, p. 243.
41. EULER (H. von) et MYRBAECK (K.). — Z. physiol. Chem., **150**, 1925, p. 1.
42. FUERTH (O.). — Biochem. Z., **150**, 1924, p. 265.
43. SCHWARTZ (O.). — Wien. Klin. Wochenschr., **24**, 1911, p. 267.
44. POPPER (H.). — Biochem. Z., **162**, 1925, p. 271.
45. PIRRONE (F.). — Ann. Chim. applicata, **24**, 1934, p. 128.
46. IMSENECKY (A.). — Bull. Acad. Sc. USSR, **10**, 1932, p. 1578.
47. READER (V.). — Biochem. J., **21**, 1927, p. 904.
48. LODDER (J.). — *Die anaskosporogenen Hefen*, p. 57. — Verhand. Akad. Wetenschappen, Amsterdam, 2^e section, t. **32**, 1934.
49. BERTRAND (G.). — Compt. rend., **152**, 1911, p. 225; **154**, 1912, p. 616.
50. BORTELS (H.). — Biochem. Z., **182**, 1927, p. 301.
51. HARPUDER (K.). — Biochem. Z., **183**, 1927, p. 58.
52. ELVEHJEM (C. A.). — J. Biol. Chem., **90**, 1931, p. 111.
53. GRAVES (J. E.), ZOBELL (C. E.) et GREAVES (J. D.). — J. Bact., **16**, 1928, p. 409.
54. RICHARDS (O. W.). — J. Biol. Chem., **96**, 1932, p. 405.
55. MICHAELIS (L.). — Biochem. Z., **109**, 1920, p. 165; **119**, 1921, p. 307.
56. TANNER (F. W.). — Chem. Reviews, **1**, 1925, p. 397.
57. LASH MILLER (W.). — J. Chem. Education, **7**, 1930, p. 257.
58. PLUECKER (H.). — Chem. Zentr., **1909** (n° 1), p. 1973.
59. FUNK (C.) et DUBIN (H. E.). — J. Biol. Chem., **44**, 1920, p. 487.
60. NIELSEN (N.). — Compt. rend. lab. Carlsberg, **19**, 1933, n° 16.
61. NIELSEN (N.). — Compt. rend. lab. Carlsberg, **21**, 1935, n° 7.
62. BERTRAND (G.). — Bull. Soc. Chim., **31**, 1904, p. 1188 et 1289.
63. KOEGL (F.) et KOSTERMANS (D. G. F. R.). — Z. physiol. Chem., **228**, 1934, p. 113. — KOSTERMANS (D. G. F. R.). *Over hétéro-auxine*. Thèse, Utrecht, 1935.

64. GOUWENTAK (C. A.) et HELLINGA (G.). — Meded. Landbouwhoogeschool, Wageningen, t. **39**, 1935, n° 6.
65. ROWLANDS (I. W.) et CALLOW (R. K.). — Biochem. J., **29**, 1935, p. 837.
66. COPPING (A. M.). — Biochem. J., **23**, 1929, p. 1050.
67. RICHARDS (O. W.). — J. Biol. Chem., **96**, 1932, p. 405.
68. LODDER (J.). — *Die anaskosporogenen Hefen*. Verhand. Akad. Wetenschappen, Amsterdam. 2^e section, t. **32**, 1934.
69. STELLING-DEKKER (N. M.). — *Die sporogenen Hefen*. Thèse, Utrecht, 1931.
70. GUILLIERMOND (A.). — *Les Levures*. Paris, 1912.
71. SLATOR (A.). — J. Chem. Soc., **119**, 1921, p. 1115.
72. BERTRAND (G.). — Bull. Soc. Chim. Biol., **18**, 1936, p. 213.
73. BERTRAND (G.) et WEBER (A. Ph.). — Compt. rend., **202**, 1936, p. 1629.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages.
INTRODUCTION	7
I. — APERÇU HISTORIQUE	11
<i>a.</i> Expériences avec la folliculine sur les plantes supérieures	11
<i>b.</i> Expériences effectuées avec d'autres hormones sur les plantes	14
<i>c.</i> Expériences avec des hormones sur les organismes unicellulaires	15
II. — LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	18
1. La solution nutritive	18
2. La purification des composants de la solution nutritive	21
<i>a.</i> La purification de l'eau	22
<i>b.</i> La purification des sels	24
<i>c.</i> La purification du glucose	25
3. La détermination de la croissance	25
4. Le thermostat	30
5. Les hormones	30
6. La préparation des solutions d'hormones	33
7. Le choix des levures	35
8. La technique expérimentale	39
9. L'ensemencement des fioles	40
10. La précision de notre méthode	41
III. — LES RÉSULTATS DES RECHERCHES SUR L'ACTION DES HORMONES	43
1. Expériences avec la folliculine	43
2. Expériences avec le benzoate de dihydrofolliculine	57
3. Expériences avec la testostérone	59
4. Expériences avec l'androstérone	60
5. Expériences avec l'insuline	61
6. Expériences avec l'adrénaline	63
7. Expériences avec la thyroxine	63
8. Expériences avec l'hétéro-auxine	64
9. Rapports entre la quantité d'hormone ajoutée et son action stimulante	66
10. Observations morphologiques	67
IV. — L'INFLUENCE DE CERTAINS MÉTALLOÏDES ET MÉTAUX SUR L'ACTION STIMULANTE DE LA FOLLICULINE	68
V. — CONCLUSIONS	72
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	74

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

RELATIONS ENTRE LA CONSTITUTION DU
SUBSTRAT ET LE POUVOIR CATALYTIQUE
DES IONS OH DANS L'HYDROLYSE

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 27 juin 1936.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

C. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

